



**ANDREIA ELISA  
FERNANDES  
CORREIA**

**CARATERIZAÇÃO DE LEVEDURAS  
IMOBILIZADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO**



**ANDREIA ELISA  
FERNANDES  
CORREIA**

**CARATERIZAÇÃO DE LEVEDURAS  
IMOBILIZADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, no ramo Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor Filipe Centeno, Diretor de Produção e de I&D da Proenol.

**Dedico este trabalho à minha mãe, Dona Otília.**

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva  
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria de Fátima da Silva Martins Gonçalves Reis  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Lisboa

Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, agradeço todo o apoio, a paciência, a compreensão, as críticas relevantes e sugestões construtivas, a orientação e a disponibilidade demonstrada ao longo de todo o estágio, especialmente nesta fase final.

Ao Doutor Filipe Miguel Monteiro Centeno da Costa, agradeço a oportunidade de realizar um estágio em ambiente industrial e uma formação sobre citometria de fluxo na Faculdade de Ciências de Lisboa (FCUL). Agradeço o apoio, a orientação e a disponibilidade demonstrada ao longo do trabalho. Agradeço-lhe ainda o facto de me ter dado a liberdade e as condições necessárias para realizar este trabalho.

Ao Prof. Doutor Rogério Tenreiro e à Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Tenreiro agradeço por terem partilhado os seus conhecimentos sobre a técnica de citometria de fluxo. Sem a aquisição desses conhecimentos não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço-lhes ainda o acolhimento, a amizade e o incentivo que demonstraram durante a minha estadia em Lisboa.

A todos os funcionários da Proenol agradeço a boa disposição e simpatia demonstradas. Especialmente às colegas do laboratório, Rute, Ana e Maria das Dores agradeço os conhecimentos transmitidos e o apoio demonstrado ao longo do meu trabalho. Aos colaboradores da produção agradeço a disponibilidade e colaboração prestada na recolha de amostras e por terem permitido e permanecido comigo até mais tarde, depois dos seus horários de trabalho.

Agradeço à minha família por todo o apoio incondicional e pela compreensão demonstrados ao longo de todos estes anos. Especialmente à minha mãe com quem compartilhei as minhas inquietudes e preocupações. Foi a minha mãe que me ajudou a tornar-me naquilo que sou hoje. Muito Obrigada!

Um enorme agradecimento a todos aqueles que me foram acompanhando, de uma forma mais ou menos próxima, ao longo de todo o meu percurso académico e em especial durante a realização desta última etapa.

## palavras-chave

Citometria de fluxo, levedura imobilizada (LSE), *Saccharomyces cerevisiae*, rehidratação, inoculação, conservação.

## resumo

O trabalho apresentado nesta tese realizou-se entre Setembro de 2012 a Outubro de 2013 e teve como objetivo principal a implementação da técnica de citometria de fluxo na Proenol - Indústria Biotecnológica, Ltd. Para a realização deste trabalho recorreu-se à técnica multiparamétrica de citometria de fluxo, para caracterizar células de levedura, e à cinética fermentativa, para monitorizar a evolução das fermentações. A caracterização focou-se nas propriedades fisiológicas das leveduras permitindo um acompanhamento da evolução e heterogeneidade da vitalidade e do estado adaptativo das células de levedura. Os parâmetros monitorizados por citometria de fluxo neste trabalho foram: células viáveis; células metabolicamente ativas; células com membrana íntegra; lípidos neutros e trealose.

A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada numa matriz de alginato de cálcio, identificada comercialmente por ProElif® para produção de espumantes, sendo inoculada diretamente no vinho. Todavia, as esferas de ProElif® podem ser previamente rehidratadas para casos específicos, como os das paragens das fermentações em garrafas. Com o aparecimento de um nicho de mercado que utiliza o ProElif® para reiniciar fermentações paradas, surgiu o interesse por parte da empresa Proenol em avaliar o efeito da rehidratação sobre a levedura imobilizada ProElif® e, em simultâneo, comparar a inoculação de leveduras com e sem rehidratação em vinho. Outro interesse demonstrado pela empresa e que foi alvo de estudo neste trabalho, prende-se com a conservação das leveduras imobilizadas em condições diferentes das recomendadas pela Proenol. Neste estudo, foi avaliado o impacto de temperaturas superiores às recomendadas e acompanhou-se o estado fisiológico das leveduras durante 4 meses de conservação. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a rehidratação é uma etapa importante para melhorar a cinética fermentativa, tendo-se observado um arranque de fermentação mais rápido e uma redução na duração da segunda fermentação.

No estudo de conservação, constatou-se que as leveduras poderão ser conservadas tanto à temperatura A como à temperatura B, mantendo viabilidades e vitalidades semelhantes. No fim do ensaio observou-se que as leveduras produzidas com a mesma composição mantêm uma boa viabilidade e vitalidade sem variações da heterogeneidade populacional. As células de leveduras conservadas à temperatura C demonstraram ser incapazes de sobreviver embora tenham indicado a possibilidade de sobrevivência por períodos curtos de tempo.

## keywords

Flow cytometry, immobilized yeast (LSE), *Saccharomyces cerevisiae*, rehydration, inoculation, conservation.

## abstract

The thesis based on a work performed between September 2012 and October 2013 consisted mainly in the implementation of the flow cytometry technique occurring in the enterprise Proenol - Indústria Bioetnológica, Ltd. For this study, we resorted to the use of a multi-parametric flow cytometry method, in order to characterize the yeast cells, and the fermentative kinetics, to monitor the fermentation progress. The characterization focused on the physiological properties of yeasts intending to thoroughly assess the evolution and the heterogeneity of vitality and adaptive state from their cells. The parameters monitored by low cytometry were: viable cells; metabolically active cells; intact cell membranes; neutral lipids and trehalose contents.

The yeast used was *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on a calcium alginate matrix, commercially identified as ProElif® for the sparkling wine production which it's directly inoculated it into the wine. However in some specific cases, as stuck fermentation in bottle, the yeast beads of ProElif® can be previously rehydrated. The surging of a niche market which frequently applies ProElif® to restart stuck fermentations, increased the Proenol interest on the evaluation of the effects of rehydration process under the immobilized yeasts ProElif® simultaneously compare inoculation with and without yeasts rehydration in wine. The company has shown a simultaneous interest, targeted on this study, concerning to the immobilized yeast conservation properties, under the different conditions than those used at Proenol. Hence, in this study, consist on the assessment of the impact of higher temperatures to those recommended as well as the yeasts physiological condition during a conservation period of four months.

Therefore, the results has shown that the rehydration proved to be a vital phase on the improvement of fermentative kinetics, achieving a faster fermentation start and reducing the time of the second fermentation. Both inoculation tests of rehydrated yeasts proved that adapted rehydration originates better results. The use of adapted rehydration solution with a nutritional supplement was beneficial to the cells, allowing them a better adaptation to the common stress conditions of rehydration and providing a second fermentation with a fast consumption of sugars without loss of viability and vitality.

Finally, the conservation study proved that at both temperatures, A and B, yeasts can be conserved displaying similar viabilities and vitalities. At the end of this study, the yeasts with similar composition revealed good viability and vitality, without variations on the population heterogeneity. Still, the yeast cells proved to be unable to survive on high temperatures, around C temperature, although they have indicated the possibility to survive for short periods of time.

## Índice

Índice de figura.....	iv
Índice de tabelas .....	viii
Abreviaturas.....	ix
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográficas .....	4
2.1 Leveduras.....	4
2.1.1 Características Gerais .....	4
2.1.2 Seleção da estirpe .....	6
2.1.2.1 Estirpe comercial.....	7
2.1.3 Leveduras secas ativas (LSA).....	8
2.1.4 Leveduras secas imobilizadas (LSE).....	9
2.1.5 Leveduras rehidratadas .....	11
2.2 Citometria de fluxo .....	13
2.2.1 Princípio da citometria de fluxo .....	13
2.2.2 Fluoróforos .....	14
2.2.3 Constituição do citómetro.....	15
2.2.4 Caraterização do estado fisiológico das leveduras por citometria de fluxo ..	15
2.2.4.1 Viabilidade e Vitalidade.....	16
2.2.4.2 Lípidos Neutros .....	18
2.2.4.3 Trealose .....	19
3 Materiais e métodos .....	22
3.1 Material de uso corrente em laboratório .....	22
3.2 Soluções e reagentes utilizados.....	22
3.3 Reagentes utilizados em citometria de fluxo .....	23
3.4 Microrganismo.....	24
3.5 Vinho base .....	24
3.6 Açúcares redutores.....	25
3.7 Citometria de fluxo .....	26
3.7.1 Preparação da suspensão global de LSE.....	27
3.7.2 Contagem celular.....	27



3.7.3	Análise de Viabilidade e Vitalidade .....	28
3.7.4	Análise de teores em trealose e em lípidos neutros .....	30
3.8	Procedimentos.....	31
3.8.1	Ensaio de rehidratação.....	31
3.8.2	Ensaio de inoculação .....	33
3.8.3	Ensaio de conservação.....	34
4	Resultados e Discussão .....	35
4.1	Ensaio de rehidratação .....	36
4.1.1	Ensaio preliminar.....	37
4.1.2	Ensaio final .....	38
4.1.2.1	Análise da cinética fermentativa na rehidratação.....	39
4.1.2.2	Análise da viabilidade e vitalidade celular na rehidratação .....	41
4.1.2.3	Análise da evolução de teores em lípidos neutros e em trealose na rehidratação .....	43
4.2	Ensaio de inoculação .....	47
4.2.1	Ensaio 1: Ensaio com inoculação direta (ID) das leveduras em vinho .....	48
4.2.2	Ensaio 2: Ensaio com inoculação com rehidratação standard (IRS) das leveduras em vinho.....	50
4.2.3	Ensaio 3: Ensaio com inoculação com rehidratação adaptada (IRA) das leveduras em vinho.....	53
4.2.4	Comparação das cinéticas fermentativas das fermentações com diferentes tipos de inoculação .....	55
4.2.5	Comparação de atividades esterásicas das LSE com diferentes tipos de inoculação.....	58
4.2.6	Comparação de viabilidade e vitalidade das LSE com diferentes tipos de inoculação.....	60
4.3	Ensaio de conservação .....	62
4.3.1	Ensaio 1: Lote E21 .....	62
4.3.2	Ensaio 2: Lote E24 .....	66
4.3.3	Ensaio 3: Lote IE21 .....	69
4.3.4	Comparação dos lotes em conservação .....	71
5	Conclusões e propostas de trabalhos futuros.....	74
5.1	Conclusões .....	74

5.2	Propostas de trabalho futuro .....	75
6	Referências Bibliográficas .....	76
7	ANEXOS.....	88
7.1	ANEXO A: Plano de Trabalho na Proenol .....	88

## Índice de figura

Figura 1 – a: O feixe de luz incide na célula e ocorre dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) da luz. b: fotodíodos( Z) e sensores de luz (Y). [Fonte: Partec] .....	14
Figura 2 - A via de síntese de trealose nas leveduras [Gancedo & Flores, 2004] .....	20
Figura 3 - Fotografia do interior do citómetro <i>Cyflow SL</i> (Partec), propriedade da Proenol. A - Sistema de iluminação; B – Sistema óptico; C – Sistema electrónico. (1 - Bomba de ar; 2 - Laser sólido; 3 - Cuvete de Fluxo; 4 - Câmara CCD; 5 - FSC; 6 - FL1; 7 - SSC; 8 - FL2; 9 - FL3).....	27
Figura 4 - Esquema da contagem volumétrica absoluta de células [Fonte: Partec] .....	28
Figura 5 – Identificação dos estados fisiológicos das células de levedura através de um <i>Dotplot</i> definido em detetor de fluorescência verde (FL1) e detetor de fluorescência vermelha (FL3). Quadrante 1 (Q1): células mortas; Quadrante 2 (Q2): células moribundas; Quadrante 3 (Q3): células viáveis; Quadrante 4 (Q4): células viáveis mas não cultiváveis. [Partec, software FloMax] .....	29
Figura 6 - Evolução do estado fisiológico das leveduras durante o processo de rehidratação, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, nos 4 tempos de recolha de amostras de LSE.....	38
Figura 7 – Evolução do consumo de substrato das leveduras em soluções de rehidratação adaptada (A) e standard (B) à temperatura de 30 e 37°C, em que foram incubadas a 25°C até ao fim do ensaio de rehidratação. Fase <i>lag</i> à temperatura 37 °C e 30°C. Linearizações para determinação das taxas de consumo de açúcares redutores.....	39
Figura 8 – Percentagem de células viáveis (A), de células metabolicamente ativas (B) e de células com membrana íntegra (C), ao longo do ensaio de rehidratação, em soluções de rehidratação standard e adaptada a 30 e 37°C respetivamente .....	42
Figura 9 - Evolução do teor em lípidos neutros ao longo da rehidratação das leveduras. a - Quantificação do teor em Unidades de Fluorescência média por célula; b – Evolução da heterogeneidade populacional medida pelo coeficiente de variância (CV) .....	43
Figura 10 – Evolução do teor em trealose ao longo da rehidratação das leveduras. a - Quantificação do teor em Unidades de Fluorescência média por célula; b – Evolução da heterogeneidade populacional medida pelo coeficiente de variância (CV). .....	44

Figura 11 - Análise comparativa de histogramas representativos dos teores em lípidos neutros (FL2) e em trealose (FL1) obtidos por citometria de fluxo e tratados pelo software FlowJo, para os 3 tempos de recolha de amostras de esferas (0, 7 e 24 horas) e as 4 soluções de rehidratação. A30C – rehidratação adaptada a 30° C; A37C – rehidratação adaptada a 37° C; S30C – rehidratação standard a 30° C e S37C – rehidratação standard a 37° C .....	46
Figura 12 – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas diretamente sem rehidratação prévia (ID) em vinho base, à temperatura de 18°C. ....	48
Figura 13 – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas diretamente em vinho base (ID), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares).....	49
Figura 14 - Evolução do estado fisiológico das células de levedura quando inoculadas diretamente em vinho (ID), quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores) .....	50
Figura 15 – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas com rehidratação standard (IRS) em vinho base, à temperatura de 18°C. ....	51
Figura 16 – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas com rehidratação standard (IRS), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores). 51	
Figura 17 - Evolução do estado fisiológico das células de leveduras quando inoculadas com rehidratação standard (IRS) em vinho, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores) .....	52
Figura 18 – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas com rehidratação adaptada (IRA) em vinho base, à temperatura de 18°C .....	53
Figura 19 – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas com rehidratação standard (IRA), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula	

com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores).	54
Figura 20 - Evolução do estado fisiológico das células de leveduras quando inoculadas com rehidratação adaptada (IRA) em vinho, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores) .....	54
Figura 21 – Evolução do consumo de substrato das leveduras quando inoculadas diretamente sem rehidratação prévia (ID), inoculadas com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em vinho base, à temperatura de 18°C (A). Linearizações para determinação das taxas de consumo de açúcares redutores (B) .....	56
Figura 22 - Evolução da atividade esterásica das células de leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores). a: expressa em UF/ célula, das leveduras em ID, IRS e IRA. b: expressa em valores percentuais de coeficiência de variância, das leveduras em ID, IRS e IRA .....	58
Figura 23 – Evolução da atividade esterásica, expressa em UF/célula, das células de leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) no fim da fermentação e após uma semana do fim de fermentação .....	59
Figura 24 – Percentagem de células viáveis das leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores) .....	61
Figura 26 – Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21 à temperatura de conservação C, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra ao longo do ensaio de conservação .....	63
Figura 27 – Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21, relativamente às células viáveis, das leveduras da amostra E21 nas 3 temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação .....	63
Figura 28 – Evolução da atividade esterásica do lote E21 nas 3 temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação .....	64

Figura 29 – Evolução de teor em trealose do lote E21 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por célula.....	65
Figura 30 – Evolução de teores em lípidos neutros do lote E21 às temperaturas de conservação de A, B e C ao longo do ensaio de conservação, expressa por Unidades de Fluorescência por células.....	66
Figura 31 – Evolução do estado fisiológico das células de leveduras do lote E24, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra, à temperatura C ao longo do tempo de conservação .....	67
Figura 32 – Evolução do estado fisiológico das leveduras do lote E24, relativamente às células viáveis, nas temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação .....	67
Figura 33 – Evolução da atividade esterásica do lote E24 às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por células .....	68
Figura 34 – Evolução de teores em lípidos neutros do lote E24 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por célula .....	68
Figura 35 - Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra, à temperatura de conservação C ao longo do ensaio de conservação .....	69
Figura 36 – Evolução do estado fisiológico das leveduras do lote IE21, relativamente às células viáveis, às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação .....	70
Figura 37 - Evolução de teores em lípidos neutros do lote IE21 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação.....	71
Figura 38 – Evolução do estado fisiológico das leveduras, relativamente às células viáveis, dos lotes E21, E24 e IE21 às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação .....	72

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Registo dos parâmetros limites e correções a realizar para obtenção do vinho base para a produção de espumantes .....	24
Tabela 2 – Registo das condições de coloração das suspensões com o kit comercial <i>Yeast control - Viabilit.</i> ....	28
Tabela 3- Registo das condições de coloração das suspensões com os reagentes comercial <i>Yeast control- Trehalose e Neutral lipids</i> .....	30
Tabela 4 – Registo dos parâmetros das retas associados às taxas de consumo de açúcares redutores dos 4 ensaios de rehidratação, em relação às soluções adaptada e standard e respetivas temperaturas, a 30 e 37°C .....	41
Tabela 5 – Registo dos pontos de amostragem de esferas em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores) .....	48
Tabela 6 – Registo dos parâmetros das retas associados às velocidades de consumo de açúcares redutores dos 3 ensaios de inoculação: ensaio 1 (ID), ensaio 2 (IRS) e ensaio 3 (IRA) durante a fermentação .....	57
Tabela 7 – Planeamento de trabalho, ao longo dos meses de estágio na Proenol .....	89

## **Abreviaturas**

ADP – Adenosina-5'-difosfato

ATP – Adenosina-5'-trifosfato

cFDA – Diacetato de carboxifluoresceína

ConA – Concanavalina A

CV – Coeficiente de variância

CVRVV - Comissão de Viticultura da região dos Vinhos Verdes

CFU's – Unidades formadoras de colónias

EE – Ésteres de esterol

F-6-P – Frutose -6-fosfato

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

FSC – Dispersão frontal da luz

FL1 – Detetor ótico que emite fluorescência verde

FL2 – Detetor ótico que emite fluorescência laranja

FL3 – Detetor ótico que emite fluorescência vermelha

G-6-P – Glucose – 6 – fosfato

G6P – DH – Enzima glucose-6-fosfato desidrogenase

HK – Enzima hexocinase

ID – Inoculação directa

IP – Iodeto de propídeo

IRS – Inoculação com rehidratação standard

IRA – Inoculação com rehidratação adaptada



NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NADPH - Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido

NFA – Azoto facilmente assimilável

PBS – Tampão fosfato salino

PGI – Enzima fosfoglucoose isomerase

LSA – Leveduras secas ativas

LSE – Leveduras secas encapsuladas

SSC – Dispersão lateral da luz

T-6-P – Trealose-6-fosfato

TAG – Triacilgliceróis

Tps1p – Trealose 6-fosfato sintase

Tps2p – Trealose 6- fosfato fosfatase

UDP-Glu – Uridina-difosfato-glucose

UF – Unidades de fluorescência

# 1 Introdução

A biotecnologia tem vindo a estender-se às mais diversas áreas da biologia, principalmente como ferramenta tecnológica para desenvolvimento da investigação com vista à otimização de processos industriais.

A indústria vinícola é caracterizada por ser um mercado atrativo, muito dinâmico e competitivo. Durante o último século foram feitos progressos fundamentais para otimização de processos industriais, com enormes avanços e novas descobertas científicas que revolucionaram todas as áreas, em particular a da enologia [Pretorius, 2000]. Com o surgir de novas necessidades do mercado e com o aparecimento de tecnologias inovadoras as práticas tradicionais e modernas são constantemente colocadas à prova com o intuito de melhorar a qualidade e reprodutibilidade dos vinhos. Atualmente, esta indústria tem à sua disposição vários processos fermentativos e inúmeros microrganismos identificados, caracterizados e descritos pela comunidade científica para melhorar e garantir melhores performances nas fermentações alcoólicas [Pozo-Bayón *et al.*, 2009]. Neste contexto surgiram novas tecnologias entre elas a utilização de leveduras secas imobilizadas, leveduras produzidas e comercializadas sob a forma desidratada, que poderão ser ou não rehidratadas antes de serem inoculadas em mostos ou em vinhos com finalidades específicas. A rehidratação das leveduras é uma etapa importante por garantir a preservação das células viáveis e melhorar a fermentação alcoólica. No entanto existe uma falta de conhecimento sobre o processo de rehidratação e o seu efeito no estado fisiológico das leveduras. De forma a garantir a qualidade e se atingir a melhor performance fermentativa destas leveduras surgiu a necessidade de monitorizar a sua viabilidade e vitalidade durante e após rehidratação, quando se faz inoculação de leveduras em vinho. Uma outra inovação que surgiu no mercado foi a técnica de citometria de fluxo. É considerada uma técnica rápida e consistente para avaliar a qualidade de levedura seca durante e após a produção industrial. O aparecimento desta técnica assinalou uma nova era da investigação no campo da fisiologia da levedura para fermentações alcoólicas [Sugihara *et al.*, 2006]. Atualmente tem vindo a ser regularmente utilizada em várias áreas industriais para monitorização e otimização de bioprocessos. Com a necessidade de monitorizar a produção de leveduras imobilizadas por parte da empresa portuguesa Proenol, surgiu o interesse de implementar a técnica de citometria na empresa. Nesse sentido, foi criada a

oportunidade de realizar um estágio curricular, em que numa fase inicial seria necessário um período de formação na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), sob a orientação do Prof. Dr.º Rogério Tenreiro e da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Tenreiro. O tempo de formação na FCUL foi de 2 meses, em que foi fornecido um protocolo experimental para a análise de leveduras secas imobilizadas, produzidas e comercializadas pela Proenol.

A empresa Proenol produz o ProElif® uma levedura imobilizada utilizada para produção de espumantes com inoculação direta das leveduras em vinho. Este produto é constituído por duas camadas: uma camada interna, onde se encontram as células de levedura suportadas numa matriz de alginato de cálcio, e uma camada externa, constituída só por alginato de cálcio. Esta dupla camada serve como cápsula, impedindo a migração de células para o meio exterior. Este produto é utilizado na segunda fermentação de espumantes e permite suprimir o processo de clarificação (*remuage*), com consequente redução de custos de mão-de-obra e de custos acrescentados ao produto final.

Recentemente, surgiu um nicho de mercado que utiliza o ProElif para reiniciar fermentações paradas em espumantes. Apesar de ser uma situação pouco frequente, existe a possibilidade das leveduras, durante a fermentação em garrafa, morrerem sem terminarem o consumo dos açúcares. Esta situação ocorre quando se utilizam leveduras livres e deve-se muitas vezes a:

- preparações de inóculo deficitárias de um ponto de vista nutricional
- condições do vinho base excessivamente agressivas para a levedura (elevado teor alcoólico, baixo pH, carência de nutrientes)
- condições de fermentação inadequadas (temperaturas excessivamente altas ou baixas; em zonas com correntes de ar, garrafas muito frias no momento do engarrafamento)

Nessas condições, as garrafas não atingem a pressão desejada, representando uma perda de qualidade do vinho e um entrave à sua venda como sendo um vinho de denominação de origem, por não cumprir os requisitos de pressão mínima exigida.

Em condições de paragem de fermentação a determinação da pressão na garrafa é importante para determinar o modo de ação. Se a pressão for inferior a 2-3 bar, pode-se preparar um inóculo líquido e reinocular as garrafas com levedura na forma livre. Se a pressão for superior a 3-4 bar, a reinoculação torna-se problemática devido ao fato da adição dos adjuvantes de removimento promoverem um fenómeno de *gushing*, onde ocorre

uma perda de vinho sob a forma de espuma. Dependendo das características do vinho esta perda pode ser mais ou menos violenta, acabando na maioria das vezes por não compensar fazer a reinoculação devido ao elevado volume de vinho perdido. Quando assim é, a solução passa por esvaziar as garrafas manualmente para um tanque, lavá-las, secá-las, fazer acertos ao vinho e engarrafar novamente. Claro que este é um processo que dependendo da quantidade de garrafas pode ser moroso, requerer muita mão-de-obra devido à inexistência de equipamento para tal tarefa, ficando assim muito dispendioso.

Para estas situações, e uma vez apurada a causa da paragem de fermentação, a utilização de leveduras imobilizadas rehidratadas pode ser uma solução. Quando se inoculam leveduras imobilizadas rehidratadas em vinhos com 3 a 4 bar de pressão, a perda de vinho sob a forma de espuma é praticamente inexistente e a fermentação dos açúcares, não consumidos previamente pelas leveduras livres, ocorre em toda a extensão.

Estudos prévios, realizados pela Proenol, revelaram que a inoculação direta de leveduras secas imobilizadas também pode ser utilizada no entanto a velocidade de degradação do açúcar é mais lenta. Por isso, a etapa de rehidratação prévia à inoculação parece ser importante quando se pretende utilizar as leveduras imobilizadas para rearranque de fermentações paradas de vinhos espumantes.

Para este trabalho propõe-se fazer uma avaliação do efeito da rehidratação sobre a levedura imobilizada ProElif® e em simultâneo, uma comparação entre a inoculação de leveduras rehidratadas com leveduras não rehidratadas em vinho. Este tipo de avaliações não está descrito, suscitando assim interesse por parte da empresa Proenol. Para realizar este estudo recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, para acompanhar o estado fisiológico das células, e à cinética fermentativa, para acompanhar a evolução das fermentações.

Um outro tema que também foi alvo de estudo neste trabalho prende-se com a conservação das leveduras imobilizadas fora das condições de conservação recomendadas pela empresa. A temperatura de conservação das leveduras recomendada pela Proenol, é de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . No entanto, nem sempre há condições, por parte dos clientes e das transportadoras, para seguir essas recomendações, acabando por submeter pontualmente as leveduras a temperaturas superiores às recomendadas. De modo a avaliar o impacto de temperaturas superiores às recomendadas, monitorizou-se o estado fisiológico das leveduras de vários lotes de ProElif® submetidas a diferentes temperaturas de conservação (A, B e C), recorrendo à técnica de citometria de fluxo.

## 2 Revisão Bibliográficas

### 2.1 Leveduras

Durante séculos, as leveduras têm sido utilizadas pelo Homem por serem a chave para o sucesso de processos fermentativos, como acontece na produção de bebidas alcoólicas e na panificação [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. A produção industrial e a comercialização de leveduras começaram no final do século XIX, após terem sido isoladas e identificadas por Pasteur [Pretorius, 2000] [Barnet *et al.*, 2003] [Pozo-Bayón *et al.*, 2009]. Atualmente, através das novas tecnologias e de conhecimentos científicos, é possível isolar, modificar e produzir em escala industrial estirpes de leveduras com características específicas, de modo a satisfazer as necessidades de cada indústria alimentar [Ostergaard *et al.*, 2000] [Barnet *et al.*, 2003] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. Uma das leveduras produzida em grande escala industrial, responsável por induzir fermentações eficazes e produtivas é a *Saccharomyces cerevisiae* [Bekatou *et al.*, 2006] [Pozo-Bayón *et al.*, 2009] [Carrascosa *et al.*, 2011] [Buxaderas *et al.*, 2012]. Durante muitas décadas, essas capacidades elevaram-na para um patamar de excelência, como levedura modelo para a maioria dos processos biológicos, e consequentemente tornou-a foco de investigação científica [Ostergaard *et al.*, 2000] [Chi & Arneborg, 2000] [Barnet *et al.*, 2003] [Bekatou *et al.*, 2006] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. Atualmente, a *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais estudada, e a nível económico é a mais procurada e utilizada para processos biotecnológicos [Barnet *et al.*, 2003] [Deak, 2009] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012].

#### 2.1.1 Características Gerais

As leveduras do género *Saccharomyces* são microrganismos unicelulares heterotróficos, integrados no domínio Eukaryota, no reino *Fungi* e no filo Ascomycota. São dependentes de compostos de carbono – D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, D-glucitol, entre muitos outros – para obtenção de energia como meio de sobrevivência. Estas leveduras são anaeróbias facultativas que podem metabolizar açúcares redutores em condições tanto de anaerobiose, usando a fermentação como processo energético, como de aerobiose, utilizando a respiração para obtenção de energia. Assim sendo, as leveduras quando expostas à presença de oxigénio, realizam a respiração para converterem a sua fonte

energética em biomassa, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água, ao passo que quando privadas do mesmo, os açúcares são fermentados originando o etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Estes microrganismos são globulares, apresentam-se em várias formas (elipsoide ou alongada) e tamanhos (entre 5 a  $30\mu\text{m}$ ) [Kurtzman *et al.*, 1998] [Boulton *et al.*, 1999] [Flores *et al.*, 2000] [Barnet *et al.*, 2003] [García, 2004] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012].

A espécie *S. cerevisiae* é responsável por conduzir as duas fermentações alcoólicas: a primeira e a segunda fermentação alcoólica. Durante essas fermentações as leveduras são expostas a uma variedade de condições desfavoráveis, presentes ou desenvolvidas, no meio fermentativo, tais como: elevadas concentrações iniciais de etanol entre 8-11%, com um aumento de 1-1,5 % durante o processo; baixas temperaturas, normalmente inferior a  $16^\circ\text{C}$ ; baixo pH, inferior a 3,3; elevadas pressões de  $\text{CO}_2$ , atingindo 5-6 bar no fim da fermentação; concentração de dióxido de enxofre livre até 25 mg/L, consumo total de azoto assimilável, desequilíbrios nutricionais e presença de substâncias tóxicas e inibitórias das leveduras [Jackson *et al.*, 2008] [Ma *et al.*, 2010] [Carrascosa *et al.*, 2011] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. Essas condições podem levar à inibição do crescimento de microrganismos, e à paragem ou amuo da fermentação. A fermentação é designada por fermentação parada ou incompleta, no caso de todo o açúcar disponível no vinho não ser convertido em álcool e  $\text{CO}_2$ . Por sua vez, as fermentações amuadas ou lentas são caracterizadas por um abrandamento no consumo de açúcares devido à redução de atividade de transporte de açúcares para o interior da célula, que atua como um mecanismo de resposta adaptativa da *S. cerevisiae* [Pretorius, 2000]. Rectificar este tipo de fermentações é um desafio que nem sempre consegue ser superado [Bisson *et al.*, 1999]. No entanto existem duas formas para iniciar fermentações paradas, seguindo as recomendações propostas pelo produtor de leveduras ou utilizando leveduras secas encapsuladas. As leveduras encapsuladas têm vindo a ser a opção usada pelos produtores de vinhos por ser uma técnica conveniente, vantajosa e por melhorar a qualidade dos vinhos quando comparada com os métodos tradicionais para reiniciar este tipo de fermentações. Além disso, permite reduzir a mão-de-obra e minimiza os desperdícios de vinho.

Com o abrandamento ou paragem de fermentações alcoólicas nas condições mencionadas anteriormente as leveduras são sujeitas a múltiplas alterações no seu estado fisiológico,

afetando o seu crescimento, a sua capacidade fermentativa, os seus mecanismos reguladores das vias metabólicas e a sua viabilidade celular [Pérez-Torrado *et al.*, 2005]. Para que a célula possa responder eficientemente a essas alterações é necessário que as membranas das células apresentem uma boa integridade e composição membranar [Jenkins *et al.*, 2011]. A membrana plasmática é uma estrutura fluida e dinâmica, composta por ligações não covalentes entre agregações lipídicas e proteicas. Esta não só funciona como barreira entre o citoplasma e o exterior, como permite manter os componentes intracelulares essenciais para a manutenção do potencial membranar, a passagem de nutrientes do exterior para o interior da célula e a libertação de produtos residuais do metabolismo celular. Assim sendo, a membrana é permeável de uma forma seletiva e dependente da sua composição lipídica e dos seus sistemas de transporte para controlo das trocas com o meio exterior [Konings, 2006] [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006] [Jenkins *et al.*, 2011] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. A fluidez membranar é controlada por ácidos gordos e esteróis, particularmente pelo ergosterol. O ergosterol, um esteroide não polar, é responsável por diversas funcionalidades membranares importantes, tais como a estrutura, a permeabilidade e a modulação da fluidez. A ausência ou redução deste composto origina alterações na permeabilidade da membrana e inibe o crescimento celular [Thevissen *et al.*, 2003] [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006].

### **2.1.2 Seleção da estirpe**

A produção de vinhos de qualidade com a mesma personalidade é um problema constante para os produtores de vinho, devido às variações na biodiversidade da microflora após cada ano de colheita. Atualmente, os progressos na área da biotecnologia permitem uma melhor seleção de estirpes para obtenção de processos de vinificação rentáveis e de produtos que refletem as características específicas desejadas. Na indústria vinícola, as estirpes de leveduras devem ser capazes de se adaptarem e completarem fermentações alcoólicas, tanto em mostos ou como em vinhos. Quando inoculadas devem predominar e reprimir a flora indígena, permitindo um melhor controlo microbiológico do processo e obtenção de fermentações rápidas e previsíveis, que se traduzem na qualidade reprodutível do produto final [Fleet, 2008] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. Por este motivo, a enologia moderna recorre ao uso de leveduras “*starter*”, maioritariamente de estirpes de *Saccharomyces*

selecionadas de várias regiões com tradição vinícola [Zuzuaregui *et al.*, 2006]. A seleção e adição de leveduras permitem a produção de vinhos de qualidade garantida ao interferir com determinados fatores, tais como reduzir o tempo de fermentação, utilizar microrganismos com maior resistência ao etanol, prevenir a formação de compostos indesejáveis que interferem com o aroma e o sabor do vinho, e aumentar a tolerância ao dióxido de enxofre [Martínez-Moreno *et al.*, 2012]. No entanto, são vários os fatores que limitam significativamente o número de leveduras aptas a realizar a fermentação alcoólica de mostos e vinhos. De modo a ter leveduras adaptadas às condições de fermentação em mosto é necessário realizar uma seleção a partir de leveduras isoladas da vinha e/ou da cave. A seleção de leveduras não é mais do que um estudo quanto à resistência da levedura a diferentes stresses fermentativos, como elevadas concentrações de etanol, baixos pH's, meios desequilibrados nutricionalmente e elevadas temperaturas. Após a realização desse trabalho e aplicando os critérios de seleção definidos, é possível selecionar a estirpe com determinadas características para a obtenção de um vinho com requisitos específicos. A levedura resultante da seleção permite obter um melhor controlo da fermentação alcoólica, ao reduzir o risco de surgirem características sensoriais indesejadas durante a fase de crescimento e metabólica das células indígenas e de contaminantes da cave. Desta forma promove determinados estilos de vinho ao melhorar certas características, tais como o grau alcoólico, teor de azoto assimilável, a turbidez, temperatura, bem como as especificidades de vinhos, quanto à revelação de aromas, de texturas, preservação da cor, entre outros aspetos [Manginot *et al.*, 1998] [Julien *et al.*, 2000] [Carrascosa *et al.*, 2011] [Martínez-Moreno *et al.*, 2012].

#### **2.1.2.1 Estirpe comercial**

Para a realização deste estudo optou-se por utilizar a estirpe comercial de *S. cerevisiae* designada por QA23. Esta estirpe foi selecionada em 1988 na Quinda de Azevedo por uma equipa de investigadores portugueses da universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) em colaboração com a Comissão de Viticultura da região dos Vinhos Verdes (CVRVV) e a empresa Proenol. Trata-se de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae*, portadora de características frutofílicas, recomendada para elaboração de vinhos brancos. Esta característica é importante para assegurar o final da fermentação, atendendo que os



açúcares residuais do meio fermentativo são maioritariamente de frutose. É produzida sob a forma de levedura seca ativa (LSA), pela Lallemmand, e comercializada pela Proenol, sob forma de leveduras encapsuladas desidratadas, em dupla camada de alginato de cálcio. Uma das vantagens da levedura QA23 é o fato de estarem previamente adaptadas ao álcool e de ser possível a sua inoculação direta no mosto ou no vinho [Palácios *et al.*, 2005].

Distingue-se das outras estirpes por demonstrar melhores sistemas de respostas adaptativas aos diversos tipos de condições a que é exposta, como ao stress oxidativo, à pressão osmótica, a pH's baixos, a baixas temperaturas. Também é reconhecida por apresentar resultados atrativos, que proporcionam a ocorrência de uma fermentação rápida e segura, com um consumo praticamente constante dos açúcares até ao fim [Palácios *et al.*, 2005].

### **2.1.3 Leveduras secas ativas (LSA)**

As leveduras livres secas ativas (LSA) têm sido produzidas e comercializadas há mais de 30 anos. No entanto, só nos últimos 20 anos é que se verificou um aumento considerável da sua utilização na indústria vinícola [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006] [Fugelsang and Edwards, 2007]. Encontram-se disponíveis no mercado mais de 200 estirpes de leveduras para vinho, sob a forma de levedura seca ativa com baixo teor de humidade ( $\leq 8\%$ ) [Soubeyrand *et al.*, 2006]. Os produtores de vinho, especialmente os de vinho espumante, têm optado cada vez mais pela utilização de LSA em vez das preparações de culturas de leveduras tradicionais, para a obtenção de uma segunda fermentação mais fácil e adequada aos seus objetivos [Zoecklein, 2002] [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006]. O processo de fabrico de LSA requer algumas adaptações específicas, em particular na capacidade de produzir leveduras de forma eficiente em condições aeróbias, bem como a sua sobrevivência a longos períodos de conservação, aumentando assim o seu prazo de validade sem perdas consideráveis de viabilidade e de capacidade fermentativa [Bauer and Pretorius, 2000] [Fugelsang & Edwards, 2007]. Porém, as LSA conseguem estender o seu prazo de validade consoante as suas condições de conservação. O produto é comercializado em embalagem selada, em vácuo, sendo conservado a baixas temperaturas (4°C). É recomendado que permaneça fechado até à sua utilização, de maneira a evitar a exposição das LSA à humidade e ao oxigénio [Redón *et al.*, 2008]. Antes de serem utilizadas em mostos ou vinhos, a maioria das LSA (devido ao seu baixo teor de humidade), devem ser rehidratadas

devidamente de acordo com o protocolo do produtor. A rehidratação resulta num processo de stress para as leveduras, em que as condições de rehidratação influenciarão a viabilidade e a vitalidade, assim como, a capacidade fermentativa e o estado adaptativo das células de levedura [Soubeyrand *et al.*, 2006] [Krieger-Weber, 2009]. Uma vez rehidratadas, as LSA são submetidas a uma aclimatização apropriada, antes de serem inoculadas em mosto ou em vinho. Se as LSA não estiverem no estado fisiológico adequado na altura da inoculação, estas não terão condições para lidar com as condições de stress, comprometendo a fermentação e não se obtendo as eficácias exigidas pela indústria vinícola.

#### **2.1.4 Leveduras secas imobilizadas (LSE)**

O uso de leveduras encapsuladas (imobilizadas) (LSE) tem vindo a ser estudado nos últimos 30 anos com vários progressos notórios, principalmente na área da Biotecnologia, onde tem vindo a suscitar um crescente interesse por parte de muitas indústrias [Kourkoutas *et al.*, 2004] [Nedovic & Willaert, 2005]. A tecnologia de imobilização teve um grande impacto na indústria vinícola, tendo sido uma descoberta inovadora e importantíssima para o controlo de processos fermentativos. Esta permite que os produtores de vinhos possam aperfeiçoar a produção, mais propriamente a qualidade do vinho quanto ao aroma, sabor, textura e cor [Kosseva, 2010].

A Proenol, empresa sediada em Portugal, foi a pioneira e responsável pela investigação, desenvolvimento e industrialização das leveduras encapsuladas. Oferece aos produtores de vinho uma vasta gama de produtos, com aplicações distintas, sendo exemplo o ProElif® - levedura específica para produção de vinhos efervescentes.

A imobilização das leveduras, realizada pela Proenol, consiste na inclusão de células de leveduras em cápsulas com membrana dupla permeável de alginato de cálcio, tendo o produto final aspeto de pequenas esferas desidratadas com cerca de 2 mm de diâmetro. A cápsula de alginato, um polissacarídeo natural, embora aparente ser constituída por uma estrutura sólida é na realidade uma matriz porosa, com poros de dimensões mais pequenas que as das células – microporos [Pradella, 2001]. Esta matriz impõe uma restrição espacial às células e em simultâneo permite o contacto permanente com o vinho base, facilitando a

difusão das moléculas de substrato ou produto, sem comprometer a viabilidade membranar e/ou o desempenho das células das leveduras. As microcápsulas têm uma forma esférica, de modo a ter uma elevada área superficial [Divies *et al.*, 2005]. Assim sendo, a esfera é composta por um núcleo interno, com alginato e leveduras, e uma camada externa desprovida de leveduras [Godia *et al.*, 1991]. Essa restrição permite confinar num espaço físico, uma elevada concentração de células garantindo um aumento de produtividade e de eficiência da fermentação [Freeman & Lilly, 1998]. As leveduras aprisionadas em cápsulas são previamente desidratadas com o objetivo de aumentar o tempo de conservação das esferas e facilitar o processo de inoculação em garrafas [Proenol, 2012].

Um dos principais problemas de imobilizar leveduras estava na libertação de células das esferas para o vinho causando assim turbidez e contaminação dos mesmos. Com esferas de camada dupla de alginato de cálcio, o vinho não só não fica turvo, como se reduz o risco de contaminação microbiológica [Freeman & Lilly, 1998] [Proenol, 2012] e se aumenta a tolerância à exposição de compostos tóxicos, como o próprio etanol [D'Amore *et al.*, 1990] [Norton *et al.*, 1995]. O tempo despendido para a fase de clarificação do vinho é eliminado, havendo redução de custos de mão-de-obra e de custos acrescentados ao produto final [Ma & Liu, 2010] [Salvad, 2010]. Perante alterações drásticas de pressão, pH, agitação e temperatura do meio, as leveduras encapsuladas mantêm-se estáveis [Moreira *et al.*, 1998] [Junter & Jouenne, 2004]. Não são facilmente degradadas por enzimas ou por solventes envolvidos no processo [Bergmaier *et al.*, 2005] e proporcionam a viabilidade celular e a atividade metabólica por longos períodos de tempo [Garbayo *et al.*, 2003]. Melzoch *et al.* (1994) mencionam que as leveduras imobilizadas permitem que a fermentação ocorra em baixas temperaturas e que ao serem armazenadas a temperaturas baixas aumentem a viabilidade celular.

Porém, a desvantagem na utilização de membranas com microporos é a limitação de transferência de massa, que influencia a velocidade de conversão das leveduras. Estes autores afirmam que este fator se torna significativo apenas no fim da fermentação, devido à possibilidade de crescimento das células no interior da matriz, o qual irá promover fissuras na membrana [Divies *et al.*, 2005] [Talebnia, 2008]. Estas limitações podem ser minimizadas com a redução do tamanho das esferas, com o aumento da porosidade da matriz ou até mesmo com alteração do gradiente de concentração do meio [Divies *et al.*, 2005].

Contudo, o fator chave para o sucesso das esferas imobilizadas é o fato de que estas permitirem produzir vinhos que apresentam características organoléticas iguais, senão melhores que as dos vinhos produzidos por leveduras livres [Kosseva, 2010] [Proenol, 2012].

O produto fornecido pela Proenol para o estudo deste trabalho é o ProElif®, específico para a produção de espumantes. As esferas ProElif® podem ser inoculadas diretamente no vinho base (resultante de uma primeira fermentação), após a adição de açúcares e micronutrientes, excluindo assim a rehidratação, propagação e aclimatização prévia das leveduras [Proenol, 2012]. Ao contrário das LSA, as LSE são aclimatizadas a várias condições adversas, como altas concentrações de açúcares ou elevados teores em álcool. É um produto seguro para segundas fermentações, permitindo que as leveduras realizem a fermentação sob pressão de CO<sub>2</sub>, estando protegidas da toxicidade do etanol pela dupla camada de alginato [Ma & Liu, 2010] [Salvad, 2010].

### **2.1.5 Leveduras rehidratadas**

As leveduras utilizadas para a produção de vinhos são sujeitas a condições de stress após inoculação e ao longo da fermentação. A sua sobrevivência depende da capacidade de se adaptar rapidamente às variações do meio fermentativo. Caso não se apresentem com um estado fisiológico ideal quando inoculadas, estas podem vir a comprometer a fermentação. Na prática, as leveduras incapazes de lidar com situações de stress podem causar abrandamento ou paragens bruscas de fermentações em mostos ou em vinhos, podendo nem reiniciar as mesmas. Esses problemas podem ser resolvidos, na maioria dos casos, recorrendo à rehidratação e à aclimatização de leveduras (i.e. LSA) permitindo uma melhor adaptação e capacidade de lidar com as situações adversas em vinho base [Bauer & Pretorius, 2000]. A rehidratação pode ser a etapa chave para evitar fermentações paradas e amuadas. Porém, não pode ser considerada como um processo isolado, mas sim como uma etapa importante no processo de fermentação alcoólica. Apesar da sua importância, existe falta de conhecimento sobre todo o seu papel no processo fermentativo e que tipo de práticas podem ser desenvolvidas para melhorar o seu processo, tanto para mostos como para vinhos. O comportamento da levedura durante a rehidratação, até hoje, foi pouco caracterizado e necessita de mais estudos para ser melhor compreendido. Sabe-se apenas

que, a pré-adaptação da levedura ao meio leva à redução da fase *lag*, ao aumento da atividade metabólica e ao aumento da performance fermentativa da levedura durante a fermentação alcoólica. O processo de rehidratação é um processo rápido que envolve restauração morfológica, levando à perda de componentes intracelulares importantes, e que compromete a viabilidade e a vitalidade das células. A viabilidade das células depende da composição, da pressão osmótica e da temperatura do meio de rehidratação [Soubeyrand *et al.*, 2006] [Krieger-Weber, 2009] [Zuzuregui *et al.*, 2006].

A comunidade enológica utiliza um protocolo de rehidratação standard para ativação das LSA. Esse protocolo consiste na ativação das células em água quente (37-45°C), com açúcar (5 a 50 g/L), durante 30 minutos. O protocolo pode sofrer otimizações, adequadas às características do mosto ou do vinho, como a adição de nutrientes (mistura de azoto, sais de amónio e de tiamina), de leveduras inativas ou de extratos de leveduras como suplementos de esteróis para a restauração das membranas das leveduras. A temperatura de rehidratação também poderá variar, mas a maioria dos produtores de vinho preferem que a rehidratação ocorra à temperatura de 37°C. Além disso, a solução de rehidratação não deve conter água destilada nem desionizada por ser letal às células de levedura, sendo preferível usar água corrente [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006].

Embora o processo de rehidratação seja utilizado para as LSA, este também pode ser aplicado às LSE. Exemplo de uma LSE que necessita de ser rehidratada é o ProRestart®, produto comercializado pela Proenol para reiniciar fermentações amuadas ou paradas em mostos. Trata-se de um produto com leveduras imobilizadas em duas camadas, uma camada externa constituída por leveduras em alginato de cálcio e uma camada interna com suplementos nutritivos. O protocolo standard, estipulado pela Proenol, para a rehidratação destas esferas consiste na preparação de uma solução aquosa de sacarose, a 37°C, e um tempo de rehidratação de 4 a 5 horas à temperatura ambiente. O volume da solução de rehidratação deve ser cinco vezes o peso das esferas de ProRestat®.

No caso do ProElif®, as LSE utilizadas para este estudo não requerem rehidratação devido à sua excelente performance ao longo da segunda fermentação para produção de espumantes quando inoculadas diretamente em vinho. Apesar da rehidratação não ser uma etapa importante para o ProElif®, nunca foi suficientemente questionado cientificamente ao seu impacto nas mesmas. Assim sendo de um ponto de vista biotecnológico adotaram-se estratégias para avaliar e otimizar o efeito que a rehidratação tem sobre as leveduras de

ProElif® e observar se há uma melhoria de performance fermentativo na inoculação das LSE em vinho base.

## 2.2 Citometria de fluxo

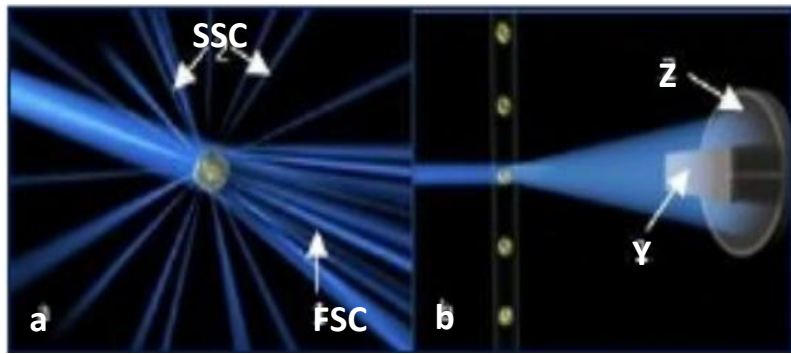
A citometria de fluxo foi impulsionada para o mundo académico no final da década de 50, como um método de contagem e análise de células sanguíneas, bactérias e partículas em aerossóis [Shapiro, 2003] [Da Silva *et al.*, 2004].

Inicialmente era direcionada para a hematologia e imunologia celular mas rapidamente expandiu-se a outras áreas, nomeadamente à biotecnologia. Sofreu uma natural evolução, sendo hoje uma técnica de rotina, nos mais variados tipos de laboratórios por todo o mundo, por apresentar exímia precisão e rapidez e por permitir uma análise objetiva e multiparamétrica. O seu sucesso atual está no fato de haver uma variedade de equipamentos de citometria de fluxo para dar resposta às necessidades do mercado [Dolezel, 1991] [Côrte- Real *et al.*, 2002] [Díaz *et al.*, 2010]

### 2.2.1 Princípio da citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas, dispersão da luz e emissão de fluorescência, de partículas que fluem numa suspensão líquida. [Loureiro, 2004]. Esta última é injetada, numa câmara de fluxo, no seio de uma solução de revestimento, o *sheath fluid*, que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Através de um fenómeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se uma a uma no centro de um fluxo laminar, a uma velocidade constante, sem se misturarem com o fluido envolvente. Os citómetros são capazes de detetar partículas ou células de diferentes tamanhos, entre 1 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetros. Na câmara de fluxo as partículas atravessam um ou mais feixes de luz provocando a sua dispersão. A luz é dispersa em vários ângulos, sendo detetada e posteriormente traduzida por um pulso de voltagem representado por um histograma, através de dois detetores: i) um localizado no lado oposto ao laser para dispersão frontal da luz ou *forward light scatter* (FSC) (figura 1a) e ii) outro num ângulo de 90° com este para dispersão lateral da luz ou *side light scatter* (SSC) (figura 1a) [Shapiro 2003]. A dispersão de FSC é detetada diretamente por fotodíodos (figura 1b) fornecendo informações sobre as

dimensões celulares. O histograma obtido com essas informações coloca as células de pequenas dimensões à esquerda e as de grandes dimensões à direita. A luz de SSC ao ser



dispersa em  $90^\circ$  é detetada por lentes, espelhos dicróicos e filtros óticos e

Figura 1 – a: O feixe de luz incide na célula e ocorre dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) da luz. b: fotodíodos (Z) e sensores de luz (Y). [Fonte: Partec]

posteriormente enviada para fotomultiplicadores, para revelar informações importantes sobre granulometria e complexidade estrutural da célula [Shapiro, 2003] [Da Silva *et al.*, 2012].

A combinação das duas formas de dispersão medidas permite, por si só, a distinção entre diferentes populações. Para visualização dessas mesmas populações é necessário recorrer a *dotplot* de duas dimensões (FSC vs. SSC). É importante que as partículas passem separadamente no feixe de luz uma vez que só desse modo o sinal obtido terá significado [Galbraith 1989]. Apesar da grande utilidade dos parâmetros de difusão frontal e lateral da luz, é na medição de fluorescências que reside a grande aplicabilidade da citometria.

### 2.2.2 Fluoróforos

Os fluoróforos são compostos com a capacidade de absorção de luz, num determinado comprimento de onda, que provoca a emissão de fluorescência num maior comprimento de onda. A diferença entre o máximo de absorção ou excitação e o máximo de emissão, é designada por deslocamento de Stokes (*Stoke's shift*), é uma característica específica de cada fluoróforo e constitui um parâmetro essencial na deteção da fluorescência, emitida em amostras biológicas. Quando o deslocamento de *Stoke* é pequeno, a deteção da fluorescência emitida pode ser dificultada pela luz de excitação, devido a sobreposição dos comprimentos de onda de excitação [Mackay, 2007].

A associação de fluoróforos com comprimentos de onda de excitação semelhantes mas diferentes comprimentos de onda de emissão (diferentes cores), permite a análise

simultânea de várias características celulares e a identificação de subpopulações [Haugland, 2005]. Os fluoróforos devem ser selecionados em função do alvo molecular que se pretende detetar (mecanismo de ação) e dos respetivos espectros de absorção e de emissão.

### **2.2.3 Constituição do citómetro**

Um citómetro de fluxo convencional, um equipamento robusto e versátil, consiste essencialmente em: i) um sistema hidráulico, constituído pela solução de revestimento, o *sheath fluid*, responsável pela focagem hidrodinâmica das células; ii) um sistema de iluminação, responsável pelo feixe de luz que incide sobre cada célula isolada, e que origina os sinais de fluorescência, FSC e SSC; iii) um sistema ótico, que capta a luz dispersa e a fluorescência emitida pelas células em todas as direções – este sistema direciona a luz para uma série de filtros e de espelhos dicróicos, que permite a passagem de luz de comprimentos de onda particulares, sendo os sinais detetados por fotodetetores e por tubos fotomultiplicadores; iv) um sistema eletrónico, que transforma os sinais em pulsos elétricos analógico – a magnitude dos mesmos é distribuída eletronicamente para canais, sendo depois apresentados em histogramas com o número de células em função do número de canais digitais e v) um sistema de análise de dados, que consiste num software para análise de toda a informação obtida, permitindo o estudo e a análise independente de subpopulações de células específicas. No final, obtém-se uma informação estatística, representada sob a forma de histogramas mono, bi ou tripamétricos [Alvarez-Barrientos *et al.*, 2000] [Shapiro, 2003].

### **2.2.4 Caraterização do estado fisiológico das leveduras por citometria de fluxo**

Este estudo tem como principal objetivo a caracterização fisiológica das leveduras com recurso a uma abordagem multiparamétrica. Atualmente, a citometria de fluxo é a técnica que permite analisar as condições fisiológicas de células de levedura de forma rápida, simples e por diversos parâmetros. [Hewitt & Nebe-Von.Caron., 2001]. Nestes parâmetros



incluem-se a viabilidade, a vitalidade e os teores intracelulares de diferentes compostos que desempenham funções importantes no seu metabolismo (como os lípidos neutros e trealose) [Sugihara *et al.*, 2006]. Contudo, para determinação do teor em lípidos neutros e em trealose é necessário uma fixação prévia das células, de modo a torná-las permeáveis [Bunthof *et al.*, 2001] [Lehnert *et al.*, 2007].

#### **2.2.4.1 Viabilidade e Vitalidade**

A análise da vitalidade de uma levedura corresponde à observação do estado fisiológico, ou seja, ao vigor da célula viva, ao passo que o estudo da viabilidade celular refere-se à quantificação de células mortas ou vivas existentes no meio.

O termo de viabilidade celular, apesar de ser muito utilizado é difícil de ser definido por ser limitado, pela microbiologia clássica, a dois aspetos: o saudável, que corresponde à presença de células vivas com capacidade de se reproduzirem e à morte celular. A microbiologia clássica busca evidências de viabilidade recorrendo ao método das unidades formadoras de colónias (CFU's) [Bapat *et al.*, 2006] e à microscopia ótica [Da Silva *et al.*, 2002] [Davey, 2011].

O método das unidades formadoras de colónias (CFU's) é normalmente conhecido pelo método de contagem de colónias em placa de Petri. Porém, a contagem apenas indica o número de células com capacidade reprodutiva em condições propícias ao seu crescimento, subestimando assim, a viabilidade real de uma amostra de células. Este método não considera as células vivas que eventualmente poderão realizar outras funções embora sem capacidade reprodutiva. Se as células na amostra estiverem sob stress, a estimativa poderá ser inferior a 50% da viabilidade verdadeira da população [Bapat *et al.*, 2006] [Díaz *et al.*, 2010] [Davey, 2011].

Na microscopia, é geralmente utilizado o teste de exclusão por azul de metileno utilizando a câmara de contagem de Neubauer. É uma técnica de coloração muito utilizada na determinação de viabilidade, que permite diferenciar células viáveis (saudáveis) das não viáveis (mortas) por observação direta ao microscópico obtendo-se uma percentagem de células viáveis. As células saudáveis, com membranas íntegras, diferenciam-se por excluir ou reduzir o corante de azul metileno, obtendo um aspeto incolor, enquanto as células com membranas comprometidas são permeáveis e coram de azul, sendo contabilizadas como

mortas. Contudo, o teste de azul de metileno apresenta várias desvantagens, não só por fornece valores superestimados de viabilidade como por apenas providenciar informações sobre o número de células que excluíram, acumularam ou metabolizaram o corante [Bapat *et al.*, 2006] [Chan *et al.*, 2011] [Davey, 2011] [Da Silva *et al.*, 2012].

Como alternativa a estes métodos, surgiu a citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma técnica muito vantajosa na análise individual de células, pois deteta uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que existem numa determinada população. Assim sendo, permite descobrir uma heterogeneidade populacional nunca antes descrita e detetar as verdadeiras percentagens de células vivas e mortas [Davey, 2011].

Para avaliar a integridade membranar da célula, utilizam-se marcadores de exclusão, que se ligam aos ácidos nucleicos das células com a membrana comprometida [Shapiro, 2003]. A integridade das membranas fornece ainda informações relevantes sobre ausência de atividade metabólica nas células dormentes- células inativas [Ueckert, 1995] [Rajakumari *et al.*, 2008]. Segundo Côrte-Real *et al.* (2002), ao utilizar um fluoróforo de exclusão a célula, mais especificamente o seu núcleo, é corada se houver perda da integridade da sua membrana periférica sendo indicativo de que a célula poderá estar moribunda, com a membrana comprometida, ou então que poderá estar morta. Caso se verifique o contrário, se as células não corarem, indicam que as membranas estão íntegras, ou seja, que trata-se de células viáveis. Membranas comprometidas levam à perda de componentes intracelulares, tais como proteínas e outros produtos fluorescentes importantes para a célula [Kolber *et al.*, 1988]. Côrte-Real *et al.* (2002) também afirmam que um marcador fluorescente é crucial para análise destes parâmetros por constituir uma maneira de revelar, de forma indireta, estruturas e funções que presentemente são impossíveis de quantificar de outra forma.

Para analisar a viabilidade celular é usado normalmente dois fluoróforos, o diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) e o iodeto de propídeo (PI), onde coram células vivas provocando emissão de fluorescência verde e células mortas de fluorescência vermelha respetivamente [Hutter, 2002].

O cFDA é um substrato fluorogénico enzimático utilizado em estudos de viabilidade por citometria de fluxo e microscopia. Trata-se de um marcador não fluorescente, lipofílico, de cargas negativas, que fica retido por mais tempo dentro da célula quando comparados com marcadores semelhantes. As moléculas não fluorescentes penetram as membranas das

células por difusão e são hidrolisadas por esterases intracelulares não específicas, produzindo compostos fluorescentes. A intensidade de fluorescência emitida é proporcional à atividade esterásica intracelular [Breeuwer *et al.*, 1994] [Ueckert,1995] [Amor, 2002]. Assim sendo, as células com membranas intactas acumulam e retêm este marcador, emitindo fluorescência verde, ao passo que as células com membranas comprometidas/ danificadas não conseguem reter a carboxifluoresceína (cF) e não emitem fluorescência, ainda que possam ter alguma atividade enzimática residual [Bunthof *et al.*, 2001] [Haugland, 2002] [Hoefel *et al.*, 2003] [Rajakumari *et al.*, 2008].

O iodeto de propídeo (PI) é um marcador fluorescente que se liga aos ácidos nucleicos mas que não se difunde em células com membranas intactas [Lehnert *et al.*, 2007]. É um agente mutagénico, de carga positiva que só penetra células com membranas comprometidas, demonstrando a correlação existente entre os danos sofridos pela membrana celular e a sua subsequente perda de viabilidade [Ueckert,1995] [Ocampo & Barrientos, 2011].

#### **2.2.4.2 Lípidos Neutros**

Os lípidos neutros são moléculas de reserva que fornecem informações relevantes sobre a viabilidade e o estado de adaptação das leveduras durante um processo fermentativo. São essencialmente constituídos por ésteres de esterol (EE) e triacilgliceróis (TAG) que se depositam agrupadamente no retículo endoplasmático, originando organelos específicos com um núcleo hidrofóbico designados por partículas ou corpos lipídicos. [Zweytick *et al.*, 2000] [Garbarino & Sturley, 2005] [Rajakumari *et al.*, 2008]. A síntese de lípidos neutros ocorre no retículo endoplasmático, onde se encontram as enzimas responsáveis pela esterificação de diacilgliceróis, em TAGs, e de esteróis, em EEs. As camadas bilipídicas compostas por fosfolípidos são capazes de acomodar até 3% de TAGs e 5% de EEs, na sua composição. Esgotado esse limite, estes compostos agrupam-se dando origem a partículas esféricas retidas no espaço intermembranar e, por aumento de depósitos, estas aumentam de tamanho surgindo os corpos lipídicos na membrana celular [Fujimoto *et al.*, 2008] [Goodman, 2008] [Gaspar *et al.*, 2008]. Os lípidos neutros são armazenados como reserva de energia e fonte de precursores metabólicos (esteróis, ácidos gordos e diacilglicerol) para a biogénese da membrana lipídica e podem ser mobilizados rapidamente de modo a satisfazer as necessidades da célula [Valachovich *et al.*, 2001] [Czabany *et al.*, 2007]. Estas

moléculas de reserva ao serem acumuladas providenciam um meio de sobrevivência durante a desintoxicação de excesso de esteróis, de precursores de esterol e/ou ácidos gordos, potenciais causadores de perturbações membranares [Müllner *et al.*, 2004] [Mannazzu *et al.*, 2008] [Rajakumari *et al.*, 2008]. Quando os níveis de reserva de lípidos neutros se tornam escassos ou indisponíveis, as leveduras têm a capacidade de racionar a quantidade que resta, alterando a composição das frações consumíveis, reduzindo a área da superfície da membrana dos organelos e diluindo o conteúdo lipídico até ao limite da sua viabilidade [Müllner *et al.*, 2004]. É de destacar que essa escassez poderá dever-se ao fato de que, no exemplo do metabolismo de ácidos gordos, as leveduras estarem sujeitas a influências de vários fatores ambientais tais como a temperatura e a composição do meio [Beltran *et al.*, 2008]. Fei *et al.* (2009) observou que as leveduras estando sujeitas a condições de stress estimulam a formação de corpos lipídicos. Nas *Saccharomyces*, os esteróis estão presentes em duas formas: esteróis livres, localizados na membrana plasmática, e EEs, acumulados nos corpos lipídicos. Dos esteróis totais, verificou-se que 90% são ergosteróis [Valachovic *et al.*, 2001] [Fujimoto *et al.*, 2008] [Goodman, 2008]. O ergosterol é uma molécula não polar, que desempenha uma papel importante na estruturação das camadas bilípidicas das membranas plasmáticas, influenciando a sua rigidez, fluidez e permeabilidade [Thevissen *et al.*, 2003] [Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006].

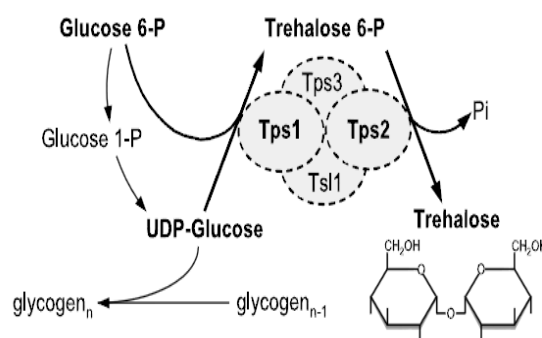
#### 2.2.4.3 Trealose

Na última década, as indústrias de processos fermentativos têm feito um enorme investimento na caracterização bioquímica e molecular do metabolismo da trealose, promovendo desta forma descobertas de novas funcionalidades deste hidrato de carbono de reserva nas leveduras.

A trealose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glicopiranosida) é um dissacarídeo não redutor constituído por duas moléculas de glucose, com ligações glicosídicas  $\alpha$  (1,1) [Aranda *et al.*, 2003] [Jules *et al.*, 2004] [Chlup, 2008]. Em *Saccharomyces cerevisiae*, o teor em trealose pode variar desde 15 % do peso seco das células até menos de 1%, conforme as condições de crescimento, da fase do ciclo de vida ou do stress ambiental [Jules *et al.*, 2004] [Ding *et al.*, 2009]. São vários os autores que defendem a existência de evidências que sugerem que a trealose não se limita apenas em ser hidrato de carbono de reserva, referem que esta

também protege os componentes do citosol contra condições adversas durante o crescimento tais como choques térmicos, osmóticos, exposição a altas concentrações de etanol e de CO<sub>2</sub>, para além de privações nutricionais [Neves & Francois, 1992] [Majara *et al.* 1996] [Silljé *et al.*, 1998] [Wingler, 2002] [Elbein *et al.*, 2003] [Aranda *et al.*, 2003] [Jules *et al.*, 2004] [Chlup, 2008] [Ding *et al.*, 2009]. Estes autores referem ainda que a *S. cerevisiae* quando exposta a essas mesmas condições, durante a fermentação, produz mais trealose, aumentando a viabilidade da levedura e protegendo as células contra a autólise [Ludovico *et al.*, 2001] [Elbein *et al.*, 2003] [Aranda *et al.*, 2003] [Chlup, 2008]. Assim sendo, foi determinado que a trealose tem várias funções importantes no desempenho metabólico das leveduras, tais como, a funcionalidade osmoprotetora durante as fermentações e em elevadas concentrações confere às leveduras maior osmotolerância, termotolerância e tolerância ao etanol [Majara *et al.*, 1996] [Elbein *et al.*, 2003] [Aranda *et al.*, 2003] [Jules *et al.*, 2008] [Chlup, 2008]. Alguns estudos revelam, também, que a trealose é responsável por substituir as moléculas de água nas membranas de leveduras, protegendo-as da desidratação quando expostas ao stress alcoólico, estabilizando e preservando a sua integridade membranar. Tal capacidade deve-se à interação da trealose com os grupos polares das cadeiras fosfolipídicas existentes nas membranas celulares [França *et al.*, 2007] [François *et al.*, 2001] [Lucero *et al.*, 2000].

Este hidrato de carbono pode ser detetado nas membranas celulares, no citosol e em vacúolos de reserva intracelulares [Keller *et al.*, 1982]. As suas moléculas são sintetizadas com a transferência de um resíduo glicosídico da uridina-difosfato-glucose (UDP-Glu) para a glucose-6-fosfato (G-6-P), originando a trealose-6-fosfato (T-6-P) pela enzima Trealose-6-fosfato sintase (Tps1p), que será



**Figura 2** - A via de síntese de trealose nas leveduras [Gancedo & Flores, 2004]

Trealose-6-fosfato fosfatase (Tps2p) (figura 2) [Elbein *et al.*, 2003] [Gancedo & Flores, 2004] [Iturriaga *et al.*, 2009].

Para quantificar a trealose sintetizada nas leveduras pode-se recorrer ao sistema reversível, por meio de fosforilases, ou ao sistema irreversível, através da hidrólise da trealose. A

hidrólise da trealose em moléculas de glucose é o método mais utilizado na industrial biotecnológica para determinar o teor deste dissacarídeo. O processo de hidrólise enzimática envolve duas trealases, a ácida e a neutra. A trealase neutra hidrolisa a trealose intracelular, enquanto a trealase ácida é direcionada para a trealose que se encontra armazenada em vacúolos. Porém, vários autores referem que a trealase ácida poderá ter uma localização extracelular, mas a sua localização e função exatas ainda não são bem conhecidas [Elbein *et al.*, 2003] [Gancedo & Flores, 2004] [Jules *et al.*, 2004] [Huang *et al.*, 2007] [He *et al.*, 2009].

Recentemente, Chlup *et al.* (2008) recorreu à Citometria de fluxo, como ferramenta de análise, na determinação do teor em trealose em leveduras durante uma fermentação alcoólica e constatou que a distribuição da população era bimodal. Esta observação é útil, pois permite determinar a distribuição do teor em trealose e a evolução ao longo do tempo, da população de interesse.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Material de uso corrente em laboratório

O material de vidro utilizado neste trabalho consistiu em frascos de pirex “Schott” de 1 L, frascos de vidro de 500 mL, balões volumétricos e pipetas volumétricas.

O material descartável consistiu em tubos com tampa de polipropileno de 10 mL (*FLmedical*, cod. 21011, *FLmedical*, *Torreglia, Itália*), frascos com tampão roscado de 30 ml de polipropileno (*FLmedical*, cod. 25032.400, *VidroLab2*, *Paredes, Portugal*), pitufos (*Deltalab*, ref.<sup>a</sup> 900008, *Deltalab S.L.U.*, *Barcelona, Espanha*) recomendados para o equipamento ABX Pentra 400 e pontas azuis e brancas de 20 µL, de 200 µL e de 1000 µL. Foram utilizados copos estéreis de polipropileno de 120 ml com tampa encarnada (ref. <sup>a</sup> ER409726, *VWR*, *Carnaxide, Portugal*) e tubos de citometria de 3,5 mL, 55 x 12 cm de poliestireno (*Sarstedt*, nº cat. 55.484, *Sarstedt*, *Rio de Mouro, Portugal*). Estes tubos são os recomendados pela *Partec* para utilização no citómetro *CyFlow SL*, por apresentarem as dimensões exatas para a contagem absoluta de células.

Foram utilizadas micropipetas (*Pipet lite*, *Rainin*, *Megalab, Portugal*) com gamas entre 200-1000 µL, 20-200 µL e 2-20 µL.

#### 3.2 Soluções e reagentes utilizados

A solução líquida, utilizada como *Sheath Fluid*, foi a água ultra pura (Água *Analar NormaPur*, ref. <sup>a</sup> 102928H, *VWR*, *Carnaxide, Portugal*).

A solução tampão fostato salina (PBS) foi preparada a uma concentração final de 10 mM (pH 6-7, sem CaCl<sub>2</sub> e sem MgCl<sub>2</sub>) por reconstituição do conteúdo de uma embalagem 10x PBS (*gibco® life Technologies*, ref.<sup>a</sup> 14200-067, *Alfagene*, *Carcavelos, Portugal*) em 1L de água ultra pura (Água *Analar NormaPur*, ref. <sup>a</sup> 102928H, *VWR*, *Carnaxide, Portugal*). A solução foi autoclavada (20 min, 121°C, 1 bar) e armazenada à temperatura ambiente. Trata-se de uma solução com um mínimo efeito sob as células, que não interfere na composição estrutural das mesmas e que permite reduzir a taxa de sinais de ruído durante as análises.

A solução de dissolução de esferas foi preparada segundo a formulação confidencial da Proenol. A sua função é dissolver a camada externa (o alginato) da esfera e extrair as leveduras para o meio em suspensão.

A solução de rehidratação standard é constituída por sacarose e água.

O adjuvante 40 é um xarope de açúcar invertido (glucose + frutose). É um produto comercializado pela Proenol, com a particularidade de ser aplicado na produção de espumantes, cuja formulação é confidencial.

O Go-Ferm Protect é constituído por uma levedura inativa especial, comercializada pela Proenol. Trata-se de um produto nutricional, rico em vitaminas essenciais (tiamina, ácido pantoténico, biotina), minerais (magnésio, zinco e manganês), aminoácido e lípidos (ácidos gordos insaturados e esteróis). Tem como principal objetivo proteger a levedura das mais diversas condições de fermentação. Deve ser utilizado juntamente com a solução de rehidratação das leveduras.

A tiamina HCL - cloridrato de tiamina ( $C_{12}H_{18}C_{12}N_4OS$ ) (ref.<sup>a</sup> 31646-12, Fagron Iberica S.A.U., Barcelona, Espanha) é utilizada como um fator de crescimento, permitindo aceleração da fermentação alcoólica e impedindo a formação de espécies químicas combinantes com o dióxido de enxofre.

O fosfato diamónio é uma fonte de azoto inorgânico e de fósforo para as leveduras, em que 100 mg/L de fosfato de diamónio incorpora 21 mg/L de azoto assimilável.

### 3.3 Reagentes utilizados em citometria de fluxo

Para a calibração do citómetro de fluxo *CyFlow SL* (Partec), utilizaram-se o reagente *Calibration Beads* de 3 µm (Partec, nº cat. 05-4018, Partec GmbH, Münster, Germany), armazenado entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz.

Para análise da viabilidade / vitalidade celular, utilizou-se o *Yeast Control – Viability Kit* (Partec, nº cat. 05-6000-02, Partec GmbH, Münster, Germany), constituído por dois reagentes: 1 mL de solução A (cFDA) e 1 mL de solução B (Iodeto de Propídeo). Estes foram armazenados entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz.

Para a determinação do teor em trealose, utilizou-se o *Yeast Control – Trehalose* (Partec, nº cat. 05-6000-04, Partec GmbH, Münster, Germany), armazenado entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz.

Para a determinação do teor em lípidos neutros, utilizou-se o *Yeast Control – Neutral Lipids* (Partec, nº cat. 05-6000-05, Partec GmbH, Münster, Germany), armazenado entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz.



### 3.4 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos ensaios foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* inclusa numa cápsula de alginato, sob a forma de esfera desidratada com 2 mm de diâmetro. As esferas são formadas por duas camadas diferentes: a camada interna, que contém as células de levedura, e a camada externa, constituída por alginato (polissacarídeo natural, extraído de algas marinhas *Phaeophyceae*) que impede que as leveduras saiam para o exterior. As esferas são parcialmente desidratadas e armazenadas à temperatura de 4°C. O processo de imobilização foi desenvolvido e industrializado pela Proenol. O produto, resultante desse processo, utilizado neste trabalho é conhecido comercialmente por ProElif®. Foram selecionadas 3 lotes de ProElif®, identificadas como E21, E24 e IE21.

### 3.5 Vinho base

O vinho base utilizado foi sujeito a vários ensaios prévios para determinação das suas caraterísticas iniciais e respetivos acertos, às caraterísticas pretendidas.

**Tabela 1** – Registo dos parâmetros limites e correções a realizar para obtenção do vinho base para a produção de espumantes

Ensaio	Referência do valor limite	Correções
Álcool (v/v)	≤ 11,5 %	*
SO <sub>2</sub> livre (mg/L)	< 10,0	*
pH	3,0	*
NFA (mg/L)	≈ 100 mg/L	*
Tiamina (mg/L)	-	0,3 mg/L

\* Informação confidencial

A correção da concentração de açúcares no vinho base foi feita com o xarope de glucose e frutose tendo em conta a concentração determinada analiticamente. Os ensaios para determinação do teor em azoto facilmente assimilável (NFA), do teor alcoólico e do teor de sulfuroso livre foram realizados segundo as instruções de trabalho internas da Proenol, tais como as suas correções (não discriminadas).

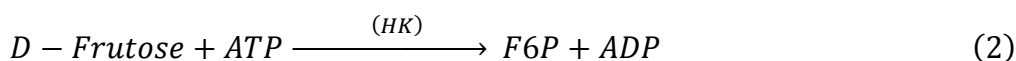
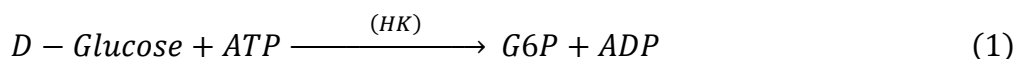
Realizadas as análises, decantou-se o vinho e prepararam-se as soluções de tiamina e de fosfato diamónio para correções nutricionais. Os cálculos para essas correções foram feitos com base nas instruções de trabalho internas da Proenol. Após a correção, o vinho foi

agitado vigorosamente com uma vareta de vidro, durante 2 minutos. Foi recolhida uma amostra, a qual foi sujeita a uma diluição de 1/6 e colocada num pitufo no aparelho ABX Pentra 400 (ABX Pentra, Horiba ABX, *Montpellier*, França) para análise do açúcar final. O aparelho ABX Pentra 400 apresenta uma gama de linearidade até 5 g/L de açúcares redutores, o que implica a necessidade de diluir as amostras com concentrações superiores. Em seguida, o vinho foi submetido a uma filtração final no sistema de filtração Millipore (previamente esterilizado a 121°C em autoclave), através de uma membrana com tamanho de poro absoluto de 0,2 µm. A filtração foi realizada com todos os cuidados de assepsia e a integridade da membrana foi testada antes e depois da filtração, tal como foi respeitado o diferencial de pressão recomendado pelo fornecedor. O vinho filtrado foi transferido à saída do sistema de filtração, para frascos de vidro previamente marcados com o volume de 200 mL e esterilizados em autoclave com uma rolha de algodão. Após o enchimento, identificaram-se devidamente os frascos de cada ensaio com etiquetas brancas. Durante esse processo, separaram-se vários frascos para servirem de testemunhas (brancos). Esses frascos acompanharam os seus respetivos ensaios nas mesmas exatas condições, mas com a particularidade de não terem esferas de leveduras imobilizadas. Este procedimento foi adotado com a finalidade de identificar possíveis contaminações.

### 3.6 Açúcares redutores

A monitorização da cinética fermentativa das leveduras foi feita através da recolha de amostras de açúcares redutores do meio fermentativo. O teor de açúcares redutores (D-Glucose e D-Fructose) foi determinado por um método enzimático com um kit *K-FRUGL* da *Megazyme* (*Wicklow*, Irlanda) e um analisador enzimático sequencial, o aparelho ABX Pentra 400 (ABX Pentra, Horiba ABX, *Montpellier*, França). Este aparelho permite a deteção de açúcares redutores dentro de uma gama de linearidade, 0,25 a 5,0 g/L. Amostras com concentrações superiores a essa gama de medição requer diluições prévias com recurso a material com rigor volumétrico.

O método enzimático consiste na fosforilação da D-Glucose e D-Fructose com adenosina-5'-trifosfato (ATP), catalisada pela enzima hexocinase (HK) em glucose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P) e, em simultâneo, em adenosina-5'-difosfato (ADP) (ver equações 1 e 2).



Posteriormente, a F-6-P é convertida em G-6-P pela enzima fosfoglucoase isomerase (PGI). Na presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, a G-6-P formada sofre oxidação pelo nicotiaminda-adenina-dinucleótido-fosfato ( $NADP^+$ ) originando a gluconato-6-fosfato e nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido (NADPH).

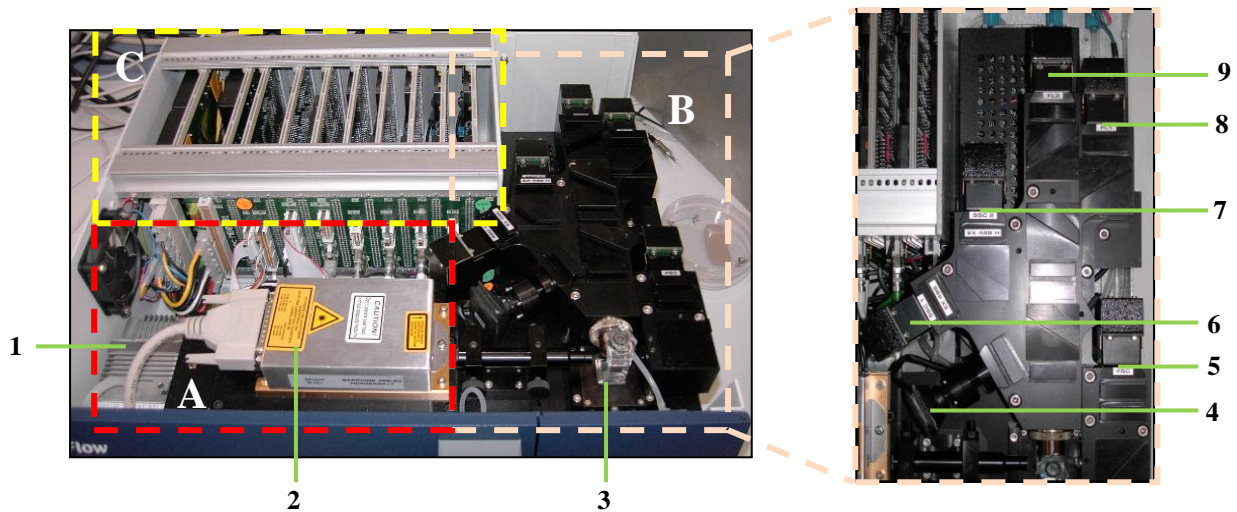


Durante a reação da equação 3 é formado NADPH em quantidades proporcionais às quantidades de glucose existentes na amostra. Assim, foi possível determinar os teores em glucose e frutose presentes nas amostras recolhidas através da quantidade de NADPH medida por espectrofotometria a 340 nm.

### 3.7 Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no citómetro CyFlow SL (*Partec GmbH, Münster, Germany*), com capacidade de determinar a contagem volumétrica absoluta. Trata-se de um equipamento portátil, composto por 5 detetores óticos (FSC, SSC, FL1, FL2 e FL3) e possui um único laser sólido (de 20mW a 488 nm). O FL1 deteta a luz emitida a um comprimento de onda entre 515 e 565 nm (emitindo fluorescência verde), o FL2 deteta a luz emitida na gama de 565 a 605 nm (emitindo fluorescência laranja) e o FL3 deteta a luz com emissão superior a 605 nm (emitindo fluorescência vermelha). O equipamento integra uma câmara CCD de modo a poder monitorizar a cuvette de fluxo.

O *Sheath Fluid* foi colocado num frasco “Schott” ao lado do equipamento, sendo filtrado por um filtro de 30  $\mu m$  (*Celltrics*, nº cat. 04-004-1000m, *Partec GmbH, Münster, Germany*) na extremidade de um tubo, que o transporta para o sistema. O esgoto líquido que provém do equipamento foi transferido para outro frasco ao lado do *Sheath fluid*. Ambos os frascos possuem eléctrodos, de modo a que seja detetado o momento para reabastecer o *Sheath fluid* ou para esvaziar o esgoto líquido.



**Figura 3** - Fotografia do interior do citómetro *Cyflow SL* (Partec), propriedade da Proenol. **A - Sistema de iluminação; B – Sistema óptico; C – Sistema electrónico.** (1 - Bomba de ar; 2 - Laser sólido; 3 - Cuvete de Fluxo; 4 - Câmara CCD; 5 - FSC; 6 - FL1; 7 - SSC; 8 - FL2; 9 - FL3)

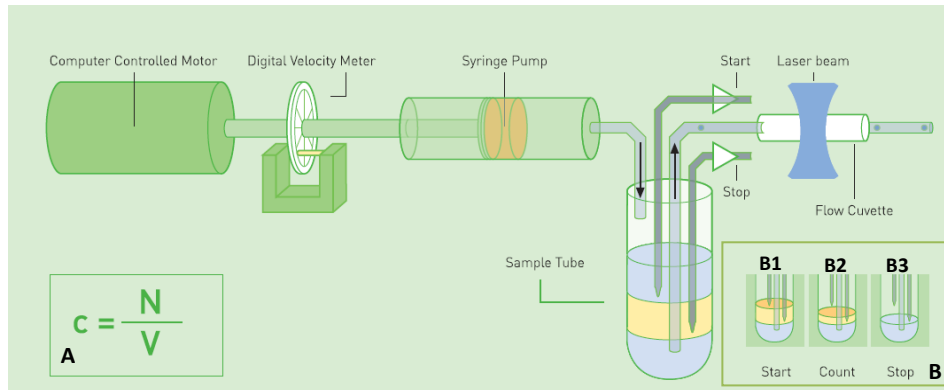
### 3.7.1 Preparação da suspensão global de LSE

As 20 esferas de LSE (em 10 tubos de ensaio) foram libertadas da matriz de alginato de cálcio, quando dissolvidas em 5,0 mL de solução de dissolução de esferas e colocadas no agitador múltiplo durante, aproximadamente, 30 min. Após a total dissolução do alginato, a suspensão de células de levedura foram centrifugadas (10 min, 4300 rpm, 4°C), ressuspendidas em 10,0 mL de solução tampão PBS 1x e colocadas no vórtex. Este passo foi repetido várias vezes, para remoção completa do alginato dissolvido e para uma lavagem adequada das células, antes das análises. A suspensão final apresentou-se com uma concentração de 20 esferas/ml de solução PBS 1x e foi mantida a baixas temperaturas, no frigorífico, para reduzir possíveis mudanças metabólicas das células antes das análises.

### 3.7.2 Contagem celular

A contagem absoluta de células (C) foi obtida pelo citómetro, através do número de células contadas (N) em 200 µl da suspensão celular (V). O equipamento aspira a amostra até atingir o eléctrodo mais curto (B1), iniciando assim a contagem, e só termina quando o eléctrodo mais comprido deixa de detetar a amostra (B2), depois de aspirar o volume de 200

$\mu\text{l}$  (ver figura 4). O tubo de citometria utilizado tem que ser o recomendado, uma vez que o seu diâmetro entra nos cálculos efetuados pelo equipamento para a contagem.



**Figura 4** - Esquema da contagem volumétrica absoluta de células [Fonte: Partec]

Como o equipamento permite contagens máximas  $1,0 \times 10^6 - 10^7$  de células totais e a suspensão celular final obtida contém, normalmente,  $1,0 \times 10^7 - 10^8$  de células totais, foi necessário recorrer a diluições em série, de modo a evitar o mínimo de perdas de células e atingir uma diluição geométrica da suspensão inicial. Assim, o citômetro pode realizar análises com fluxos baixos e mais estáveis, sem grandes variações de velocidades.

### 3.7.3 Análise de Viabilidade e Vitalidade

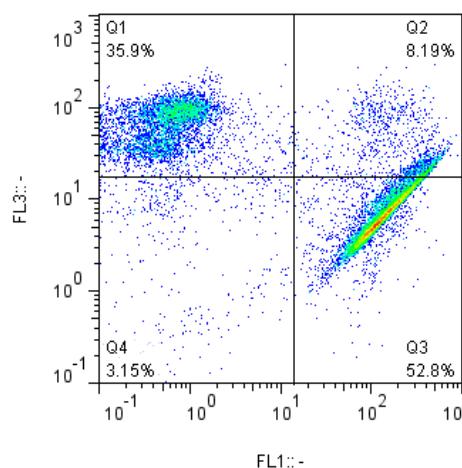
A análise de viabilidade e vitalidade foi realizada para cada amostra em suspensão. Usou-se o kit comercial (*Yeast control – Viability*) constituído por dois fluoróforos: o diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) – fluoróforo de fluorescência verde (FL1) que identifica a actividade metabólica, e o iodeto de propídeo (IP) – fluoróforo de fluorescência vermelha (FL3) que identifica a integridade membranar. A partir da suspensão global foi retirado um volume correspondente a  $5 \times 10^6$  células totais e adicionado à solução tampão PBS até um volume final de 5,0 mL. Após a diluição, foram transferidos 1,5 mL da suspensão diluída e aplicados os fluoróforos de acordo com a tabela 2.

**Tabela 2** – Registo das condições de coloração das suspensões com o kit comercial *Yeast control - Viabilit.*

Fluoróforos	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Condições de incubação
cFDA	10,0	10 min, à $T_{\text{ambiente}}$ , ao abrigo da luz
IP	10,0	5 min, à $T_{\text{ambiente}}$ , ao abrigo da luz

Selecionaram-se os parâmetros específicos do equipamento para as células a analisar. Os *gains* adotados foram: detetor FSC - 240 V; detetor SSC - 225 V; detetor FL1 - 306 V; detetor FL3 - 351 V. O *trigger* foi selecionado em FSC e os *settings* para compensações foram colocados a zeros. A amplificação utilizada foi logarítmica e a velocidade de amostragem era ajustável, variando entre 0,5 - 1,5  $\mu\text{L}$  / seg, de modo a que permitisse um fluxo de análise estável, abaixo dos 1500 eventos / seg, e a aquisição de 20.000 células por cada amostra.

Depois de adquiridos os dados das respetivas amostras, foi necessário desenhar um *gate* poligonal (R1) no gráfico de densidade (*dotplot*) FSC vs. SSC, de modo a identificar a população de interesse para cada amostra. Uma vez, definido o *gate* R1, este foi aplicado aos restantes gráficos, de forma a eliminar o *background* proveniente do *Sheath fluid* e partículas que não se pretendia analisar. Assim, com *gate* R1 aplicado ao *dotplot* FL1 vs FL3 foi possível a identificação de células viáveis, de células mortas, de células viáveis mas não cultiváveis e de células moribundas (ver figura 5). O critério de identificação baseou-se no fato de que, as células com elevada fluorescência verde



**Figura 5** – Identificação dos estados fisiológicos das células de levedura através de um *Dotplot* definido em detetor de fluorescência verde (FL1) e detetor de fluorescência vermelha (FL3). Quadrante 1 (Q1): células mortas; Quadrante 2 (Q2): células moribundas; Quadrante 3 (Q3): células viáveis; Quadrante 4 (Q4): células viáveis mas não cultiváveis. [Partec, software FloMax]

(FL1), ou seja, células com elevada atividade metabólica (porque hidrolisaram mais cFDA) e reduzida fluorescência vermelha (FL3) encontram-se ativas metabolicamente e com membrana íntegra / intacta, ou seja, são células viáveis. As células com reduzida fluorescência verde (FL1) e elevada fluorescência vermelha (FL3) encontram-se inativas metabolicamente e com membrana comprometida / danificada, ou seja, são células mortas. As respetivas percentagens foram calculadas pelo posicionamento de quadrantes no *dotplot* FL1 vs FL3 em detrimento das suas intensidades de fluorescência. Toda a aquisição e o tratamento de dados foram controlados pelo software *FloMax* (Partec FloMax 2.4d, Partec GmbH, Münster, Germany) e pelo *FlowJo* (Tree Star, Inc., versão 10.0.6, Orlando, EUA).

### 3.7.4 Análise de teores em trealose e em lípidos neutros

A técnica de citometria de fluxo é uma técnica multiparamétrica, com grande capacidade de medição de fluorescências através da utilização de fluoróforos específicos. Assim sendo, proporcionou a oportunidade de quantificar o teor em trealose e em lípidos neutros. A determinação dos teores em trealose e em lípidos neutros foi feita através da utilização de reagentes comerciais (*Yeast control – Trehalose* e *Yeast control – Neutral Lipids*), com fluoróforos específicos não revelados pela empresa comercializadora, a *Partec*. Porém, a mesma garante que o fluoróforo correspondente à trealose emite, a 508 nm, fluorescência verde (FL1) e o fluoróforo correspondente aos lípidos neutros emite, 583 nm, fluorescência laranja (FL2).

Para quantificação desses mesmos teores foram retirados um volume correspondente a  $3 \times 10^7$  células totais da suspensão global e transferidos para cada um dos dois tubos de ensaio (a amostra é separada em dois tubos – para cada parâmetro a analisar), com 3,0 mL de solução tampão PBS. Após centrifugação (10min, 4300 rpm, 4°C), o *pellet* de cada tubo foi ressuspenso em 3,0 mL de etanol 70% a 4° C para fixação das células e colocado a 4°C durante 12 h. Antes de proceder à análise, foi necessário centrifugar as células fixadas de cada tubo em etanol (10min, 4300 rpm, 4°C) e proceder a uma lavagem com a solução tampão PBS. Este passo foi repetido 2 vezes para cada tubo, de forma a eliminar o máximo de vestígios de etanol que possam vir a interferir com o sinal de fluorescência gerado. Assim, preparou-se uma suspensão de células, em 3,0 mL de solução tampão PBS, transferiu-se 1,5 mL para um tubo de citometria (devidamente identificado) e aplicou-se os fluoróforos, segundo a tabela 3.

**Tabela 3-** Registo das condições de coloração das suspensões com os reagentes comercial *Yeast control-Trehalose* e *Neutral lipids*

Fluoróforos	Volume (µL)	Condições de incubação
<i>Trehalose</i>	10,0	20 min, à T <sub>ambiente</sub> , ao abrigo da luz
<i>Neutral Lipids</i>	5,0	30 min, à T <sub>ambiente</sub> , ao abrigo da luz

As análises de citometria foram realizadas no citómetro *CyFlow SL (Partec)*, independentes uma da outra. O parâmetro do *gain* selecionado para o detetor de fluorescência verde - FL1 foi 338 V e o *gain* adotado para o detetor de fluorescência laranja - FL2 foi 323 V. Os restantes parâmetros foram selecionados conforme descritos na análise de viabilidade / vitalidade, sendo adquiridos igualmente 20.000 eventos de células / seg para cada amostra. A população de interesse foi identificada por um *gate* poligonal R1, no *dotplot* FSC vs SSC, em cada análise. Esse mesmo *gate* foi aplicado ao gráfico FL1 para determinar o histograma correspondente ao teor em trealose e ao gráfico FL2 para determinar o histograma correspondente ao teor em lípidos neutros na população de interesse. Os histogramas obtidos representam a distribuição de frequências das intensidades de fluorescências emitidas pelas células coradas com os fluoróforos. Quanto mais elevada for a intensidade de fluorescência emitida maior é o teor intracelular dos compostos corados. Assim, de modo a perceber a heterogeneidade da população de leveduras utilizou-se o coeficiente de variância (CV) como medida de dispersão relativa e desta forma, comparar a distribuição de fluorescência. O coeficiente de variação é obtido pelo software *FloMax* onde o desvio padrão (medida de dispersão) é dividido pela média das intensidades de fluorescências emitidas [Shapiro, 2003]. Assim, elevados valores de CV foram considerados representantes de uma grande variabilidade nas populações de leveduras e os valores mais baixos de CV indicadores de uma distribuição uniforme de intensidades de fluorescência na população.

### 3.8 Procedimentos

#### 3.8.1 Ensaio de rehidratação

Com o objetivo de avaliar o efeito que a rehidratação tem sobre as leveduras realizou-se o ensaio titulado por ensaio de rehidratação. Neste ensaio foram feitos 4 ensaios no total, onde foram testados 2 protocolos de rehidratação (standard e o adaptado) a duas temperaturas, a 30° e a 37°C. O protocolo de rehidratação standard utilizado pelos produtores de vinho é o protocolo referente ao processo de rehidratação das leveduras ProRestart® (descrito no ponto 2.1.5). Trata-se de um protocolo estipulado pela Proenol, indicado para a rehidratação de LSE, responsáveis por reiniciar fermentações lentas ou paradas em mostos. Adotou-se esse protocolo, para realização deste estudo, e, em



simultâneo, adaptou-se a solução de rehidratação, com adição de um suplemente nutritivo – o Go-Ferm Protect.

Para monitorização do consumo de substrato, foram recolhidas amostras da solução de rehidratação ao longo do tempo, até o consumo total de substrato. Foram selecionados 3 tempos de recolha de amostras, idênticos para os 4 ensaios, para recolha de amostra de esferas: antes da rehidratação; 7 horas após a rehidratação e 24 horas após o início da rehidratação. Cada recolha de amostra de LSE foi analisada por citometria de fluxo e caracterizada quanto à sua viabilidade / vitalidade, ao teor em trealose e em lípidos neutros. Para ambos os protocolos, foi necessário retirar o lote selecionado para este ensaio, a amostra E21, da temperatura de armazenamento ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e colocá-la à temperatura ambiente, de modo a evitar um choque térmico durante a rehidratação. Foram pesadas 15g de E21, para um copo de plástico de 120 mL esterilizado e adicionado um volume de solução de rehidratação, a  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}$ , correspondente a 5 vezes o peso das esferas. As soluções de rehidratação foram preparadas em balões de  $1000 \pm 0,4$  mL e mantidas nas estufas (a  $30^\circ$  e  $37^\circ\text{C}$ ) até serem utilizadas. Uma vez rehidratadas com as suas respetivas soluções e temperaturas, os ensaios foram incubados na estufa a  $25^\circ\text{C}$  até que passado algum tempo a temperatura estabilizou. Assim, tentou-se recriar as condições reais de rehidratação onde há uma perda gradual da temperatura ao longo da rehidratação. Os copos permaneceram destapados ao longo do ensaio permitindo a libertação do dióxido de carbono produzido, facilitando a agitação das soluções com as esferas e a recolha de amostras.

O protocolo de rehidratação adaptado surgiu com a alteração na formulação da solução de rehidratação, em que se adicionou o Go-Ferm Protect (lote: 82602640320827E). Este produto foi adicionado depois de preparada a solução de rehidratação standard e teve que ser bem dissolvido antes de adicionar às esferas, para um maior rendimento das leveduras. A sua dose de aplicação aconselhada é de 30 g/hL.

Dado que o aparelho ABX Pentra 400 (ABX Pentra, Horiba ABX, *Montpellier*, França), utilizado para monitorizar o consumo de açúcar pelas leveduras, só permite a deteção da concentração de glucose/frutose, a solução de rehidratação para este ensaio foi modificada, em que, em vez de sacarose utilizou-se o xarope de açúcar. Todas as análises reportadas neste trabalho foram feitas em duplicado.

### 3.8.2 Ensaio de inoculação

Foram utilizados 3 protocolos de inoculação: inoculação direta (ID); inoculação com rehidratação standard (IRS) e inoculação com rehidratação adaptada (IRA). Para cada protocolo, selecionaram-se 8 pontos de recolha de amostras para avaliar o estado fisiológico das leveduras, quanto às suas viabilidades e vitalidades, recorrendo à técnica de citometria de fluxo. Dos 8 pontos de recolha, 7 foram recolhidos em 7 situações cruciais da fermentação e o último ponto de recolha de esferas foi feito após o fim de fermentação, em que as leveduras permaneceram no vinho durante mais uma semana. Desta forma foi possível avaliar o estado fisiológico das leveduras dos 3 ensaios após um longo período de privação de açúcares.

Para a inoculação com rehidratação, as esferas foram rehidratadas (18 horas, a 25°C) com a solução de rehidratação a 37°C, seguindo-se os protocolos respetivos. As soluções de rehidratação standard e adaptada foram preparadas em balões de  $500 \pm 0,25$  mL e mantidas na estufa a 37°C até à sua utilização. Antes da inoculação das esferas rehidratadas, foi rejeitada a solução de rehidratação para não haver interferências na cinética fermentativa das leveduras no vinho. Para a inoculação direta, as esferas foram introduzidas diretamente nos frascos após o enchimento. O doseamento das esferas, em qualquer uma das inoculações, foi monitorizado de modo a garantir que não ficassem esferas coladas nas paredes do frasco.

A adição das leveduras em vinho foi efetuada em condições de assepsia e respeitou-se o diferencial térmico  $\leq 10^\circ\text{C}$  com o vinho. O lote selecionado para este ensaio foi o E21.

Para cada protocolo, utilizou-se 1 frasco para controlo e 16 frascos para os 8 pontos de recolha das amostras, em duplicado, perfazendo assim um total de 51 frascos. Os frascos, com o vinho base e as esferas, foram mantidos a  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  para acelerar o processo de fermentação de modo a obter resultados mais rápidos. O frasco de controlo teve como objetivo monitorizar o consumo de açúcares redutores ao longo da fermentação. A recolha de amostras de levedura foi sempre feita em cuidados de assepsia e baseou-se na taxa de consumo de açúcares redutores disponível no vinho em cada frasco. As amostras de vinho eram colocadas em pitufos e colocadas a analisar no aparelho ABX Pentra 400. Todas as análises reportadas neste trabalho foram feitas em duplicado.

### **3.8.3 Ensaio de conservação**

O ensaio realizado com o objetivo de acompanhar a evolução do estado adaptativo das leveduras a diferentes temperaturas de armazenamento (A, B e C) foi denominado por ensaio de conservação. Os lotes foram embalados em sacos contendo 90 sacos com 20 gramas de esferas, em que para cada temperatura foram colocados 20 g de ProElif® e em condições idênticas às do produto fabricado. No total foram embalados 90 sacos, em que para cada temperatura foram colocados 10 sacos de cada amostra. Além desses sacos, foi armazenado um saco de 100 g de cada amostra como medida de prevenção. Neste ensaio utilizaram-se os lotes de produção E21 (com 26 dias desde a sua produção), E24 (com 5 dias desde a sua produção) e IE21 (com 25 dias desde a sua produção). O ensaio deu-se por concluído quando se obteve a percentagem de células viáveis (células metabolicamente ativas e com membranas íntegras) previamente definida (não discriminada neste trabalho), representada por zero. As análises foram feitas quanto à viabilidade/vitalidade celular e ao teor em trealose e lípidos nas leveduras. Todas as análises reportadas neste trabalho foram feitas em duplicado.

**Devido à questão de confidencialidade, os valores correspondentes às concentrações de açúcares não serão mencionados nesta tese.**

## 4 Resultados e Discussão

A formação na FCUL permitiu a transferência do protocolo, já existente, para a Proenol. Uma vez, implementada a técnica de citometria de fluxo na empresa, foi possível avançar com a planificação e execução dos objetivos secundários descritos inicialmente. O protocolo consistia num procedimento para a preparação de uma suspensão celular global, em que era descrito o processo de dissolução das leveduras imobilizadas, para a determinação da concentração celular, da viabilidade e vitalidade das células e por último, para quantificar os teores em trealose, glicogénio (que não foi utilizado para este estudo) e lípidos neutros. Durante o período de formação, foi-me transmitida toda a informação necessária para a manutenção do equipamento, desde a limpeza até a calibração do aparelho, e permitido definir os parâmetros instrumentais definitivos a serem utilizados na empresa Proenol – Indústria Biotecnológica, Ltd.

Neste trabalho avaliou-se o estado fisiológico da estirpe QA23, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, imobilizada em esferas de alginato, identificada comercialmente por ProElif®. As leveduras de ProElif® são utilizadas para produção de espumantes e podem ser inoculadas diretamente no vinho base, excluindo assim a rehidratação, propagação e aclimatização prévia das leveduras. Todavia, estas podem ser rehidratadas para casos específicos, como o caso de paragens nas fermentações alcoólicas em garrafas.

Contrariamente às leveduras secas ativas (LSA), que são rehidratadas em água, as leveduras secas imobilizadas (LSE) são rehidratadas numa solução aquosa de sacarose. No entanto, o protocolo de rehidratação desenvolvido previamente pela Proenol não contempla o acompanhamento da evolução dos açúcares. Este apenas estipula que a etapa de rehidratação prévia à inoculação das leveduras, deverá ter uma duração de 4 a 5 horas. Desde a implementação do protocolo definido, que foi há 12 anos atrás, até à presente data

o produto teve evoluções que melhoraram a sua performance fermentativa. Porém, a rehidratação não acompanhou esta evolução. Deste modo, pretende-se com este trabalho otimizar o protocolo de rehidratação e em simultâneo comparar a inoculação de leveduras rehidratadas com a de leveduras desidratadas em vinho.

Por fim, foi realizado um estudo de conservação, a diferentes temperaturas, com a finalidade de acompanhar o estado fisiológico das leveduras ao longo do tempo de conservação e determinar quais as temperaturas ideais para conservação do produto ProElif®.

Com o objetivo de avaliar a evolução do estado fisiológico das LSE em todos os ensaios, estas foram caracterizadas quanto às suas viabilidades e vitalidades e aos teores em trealose e lípidos neutros (exceto para o ensaio de inoculação). As viabilidades e vitalidades das LSE foram analisadas em relação à percentagem de células metabolicamente ativas, à percentagem de células com membranas íntegras e quanto à percentagem de células que apresentam em simultâneo ambos os estados fisiológicos, ou seja as designadas por células viáveis.

#### **4.1 Ensaio de rehidratação**

Atualmente a indústria vinícola tem vindo a suscitar um grande interesse em métodos para assegurar um rápido arranque de fermentação, reduzindo assim a fase de adaptação das leveduras ao meio fermentativo e aumentando as suas produtividades. O tempo necessário para o arranque da fermentação alcoólica com LSE depende da atividade da célula e de outros fatores, nomeadamente das condições de desidratação, de secagem, de conservação das leveduras, das características do vinho base e da fase de rehidratação.

A fase de rehidratação é importante para as células retomarem as suas funções celulares e recuperação completa da funcionalidade membranar. Permite que as células recuperem o volume de água perdido durante a desidratação, de forma a retomar o seu tamanho inicial. No entanto, este processo provoca um rápido influxo de água através das membranas podendo vir a afetar a fisiologia das células, provocando alterações na estrutura e na funcionalidade dos vacúolos, e na integridade e funcionalidade do núcleo e das membranas celulares [Walker & van Dijck, 2006].

Em aplicações industriais, as leveduras imobilizadas podem ser rehidratadas diretamente no meio fermentativo ou requererem uma rehidratação prévia antes de inoculadas.

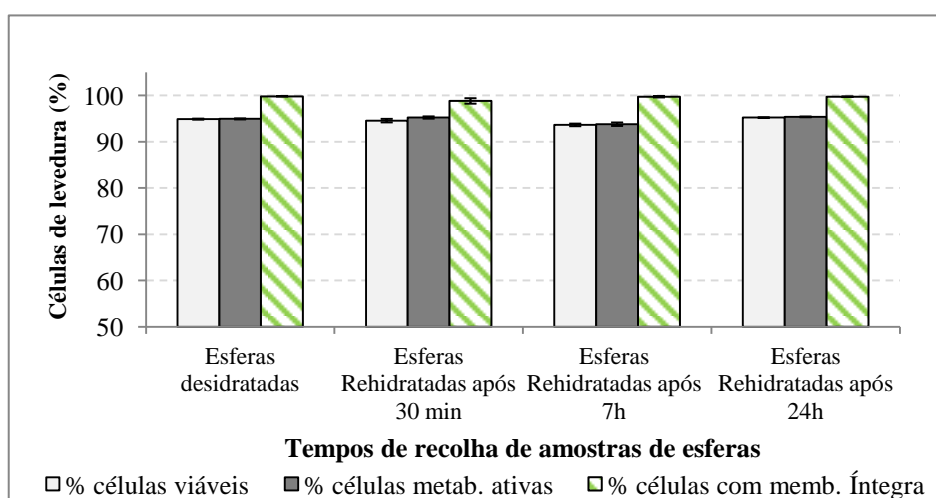
Independentemente do tipo de rehidratação, este processo sujeita as células a uma variedade de condições de stress, como o choque térmico. Se a temperatura de rehidratação exceder os valores estipulados pelos produtores de leveduras pode ser induzido um choque térmico que conduz a uma redução da eficiência das leveduras. De forma a maximizar a eficiência das leveduras, o tempo de rehidratação deve ser o mais curto possível [Attfield *et al.*, 2000] [Soubeyrand *et al.*, 2006]. O processo de rehidratação é assim muito importante a nível técnico.

De modo a otimizar o protocolo standard, realizaram-se 4 ensaios com o lote E21, em que se alteraram 3 parâmetros: a temperatura, a composição da solução de rehidratação e o tempo de rehidratação. De forma a recriar as condições de rehidratação próximas das situações reais, as leveduras após serem adicionadas às soluções de rehidratação ficaram a rehidratar a 25°C. Numa situação real de rehidratação, as leveduras são rehidratadas em grandes volumes à temperatura de 37°C. Durante essa etapa, a temperatura é reduzida naturalmente pelas condições atmosféricas a que o processo se encontra sujeito sendo que essa redução será mais lenta devido às reações exotérmicas que ocorrem durante a fermentação. A temperatura de 25°C foi escolhida com a intenção de recriar uma perda de temperatura gradual, sem no entanto, ter a certeza de que esta é a temperatura ideal para o ensaio à escala laboratorial.

#### **4.1.1 Ensaio preliminar**

Realizou-se um ensaio preliminar com um protocolo de rehidratação standard para se definirem os tempos de amostragem. As LSE foram rehidratadas a 37°C e incubadas a 25°C até que ao fim de algumas horas a temperatura estabilizou. Os teores em açúcares redutores presentes no meio foram monitorizados com recolha de amostras da solução, ao longo do processo de rehidratação. A duração do ensaio foi definida, com base no tempo de consumo e não pelo consumo total de substrato (glucose/frutose). Desta forma constatou-se que o tempo de rehidratação necessário para metabolizar os açúcares foi de 24 horas, no qual foi observada a libertação de dióxido de carbono. Uma vez determinado o tempo de rehidratação, foi estipulado que seriam feitas análises de viabilidade e vitalidade das recolhas de amostras de esferas, em 4 tempos, ao longo do processo de rehidratação: antes da rehidratação (esferas desidratadas); após 30 min de rehidratação; após 7h de rehidratação e após 24h de rehidratação, correspondentes ao consumo total dos açúcares

redutores. Estes pontos de recolha tinham como finalidade avaliar a evolução do efeito que a rehidratação exerce sobre as leveduras, em relação à viabilidade e vitalidade das células. Tendo em conta os resultados obtidos na figura 6, observou-se que as células de levedura não perderam viabilidade nem vitalidade ao longo de todo o processo de rehidratação. Apresentaram-se sempre com elevadas percentagens de células com membrana íntegra ( $\geq 99\%$ ); com atividade esterásica ( $\geq 94\%$ ) e de células viáveis ( $\geq 94\%$ ), durante as 24 h de rehidratação.



**Figura 6** - Evolução do estado fisiológico das leveduras durante o processo de rehidratação, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, nos 4 tempos de recolha de amostras de LSE.

Desta forma, definiu-se que para o ensaio final de rehidratação haveria só 3 tempos de recolha correspondentes às esferas desidratadas e às esferas rehidratadas após 7 e 24 horas.

#### 4.1.2 Ensaio final

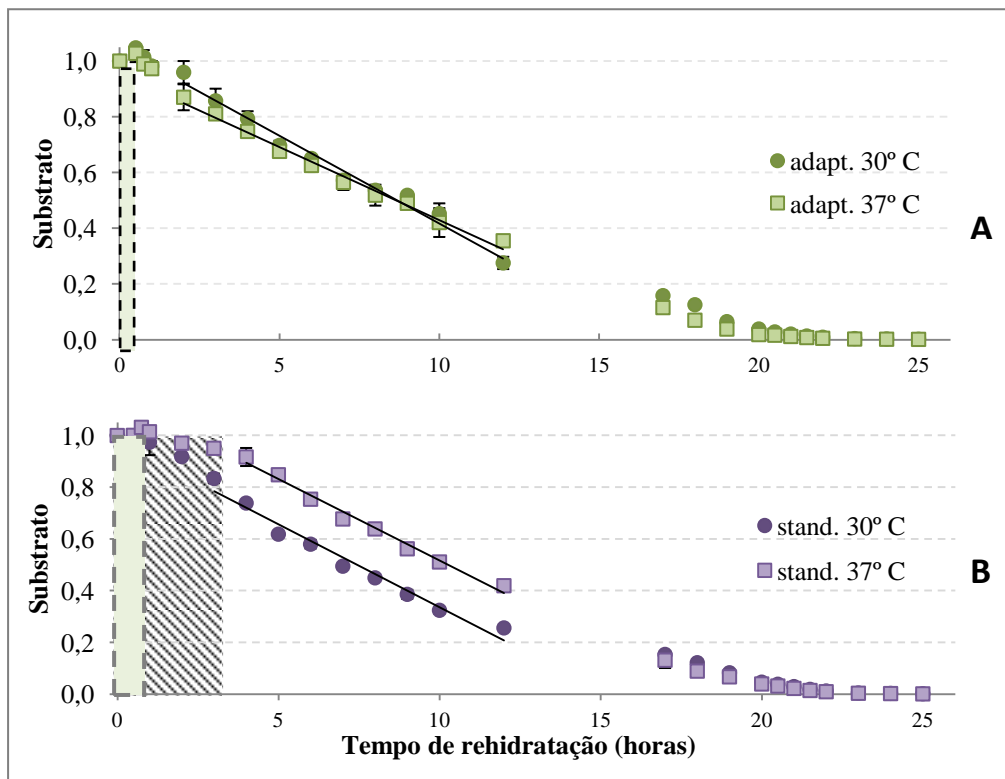
O ensaio final consistiu na avaliação de duas soluções de rehidratação (standard e adaptada) a 30 e a 37°C. Os inóculos (i.e. as leveduras rehidratadas) foram sujeitos inicialmente a uma das duas temperaturas de rehidratação, sendo incubados posteriormente a 25°C até ao fim da fermentação. Não foi possível registar a queda de temperatura dos 30 ou 37°C para os 25°C mas pressupõe-se que a descida deve ter sido, em ambas as

temperaturas, relativamente rápida. Assim sendo, ao fim de algum tempo, os inóculos apresentariam a mesma temperatura de fermentação.

Iniciaram-se 4 ensaios, todos na mesma altura e nas mesmas condições (i.e, temperatura de incubação, duração de rehidratação), segundo o procedimento descrito em 3.8.1. Neste ensaio final foram monitorizadas as cinéticas fermentativas das 4 soluções de rehidratação, com recolha de amostras de açúcares redutores presentes nas soluções, e avaliados os estados fisiológicos das LSE por citometria de fluxo, quanto à sua viabilidade e vitalidade e ao teor em lípidos neutros e em trealose.

#### 4.1.2.1 Análise da cinética fermentativa na rehidratação

A capacidade fermentativa das leveduras é o parâmetro mais importante nos processos fermentativos [Attfield *et al.*, 2000]. Assim, dada a sua importância neste ensaio, foi feita uma monitorização do consumo de substrato, através da medição dos níveis de açúcares redutores presentes no meio fermentativo.



**Figura 7** – Evolução do consumo de substrato das leveduras em soluções de rehidratação adaptada (A) e standard (B) à temperatura de 30 e 37°C, em que foram incubadas a 25°C até ao fim do ensaio de





rehidratação. Fase *lag* à temperatura 37 °C ( ) e 30°C ( ). Linearizações para determinação das taxas de consumo de açúcares redutores

Através da figura 7, verificou-se que, em todos os ensaios, após uma curta fase sem variação nas concentrações de substrato, passou a haver uma diminuição da concentração dos açúcares. As leveduras apresentaram comportamentos fermentativos semelhantes na rehidratação adaptada (7A) ao contrário das leveduras rehidratadas com a solução standard (7B). Curiosamente, observou-se que a diferença temporal no consumo de açúcares foi relativamente pequena, nas 4 soluções de rehidratação. Mas que, no final de 25 horas, os açúcares tinham sido totalmente consumidos em todos os ensaios, dando por terminadas as fermentações.

As temperaturas das soluções de rehidratação da figura 7A não afetaram a performance das leveduras, pois observou-se uma fase de adaptação ao meio semelhante, uma reativação metabólica rápida e a mesma velocidade de consumo de substrato durante a rehidratação (ver tabela 4). Este comportamento era esperado uma vez que as leveduras da figura 6A encontravam-se em condições mais favoráveis, devido à adição de suplementos nutritivos, que as protegeram de possíveis stresses do processo de rehidratação, evitando períodos de adaptação maiores e reativações metabólicas lentas.

No gráfico 6B podemos constatar que o início do desempenho fermentativo das células de levedura foi análogo, em que as soluções com as temperaturas de 30 e 37°C apresentaram a mesma taxa de consumo de açúcares redutores (ver tabela 4). No entanto a fase de adaptação, observada na figura 6B, foi diferente para ambas as temperaturas, sendo notoriamente melhor a 30°C. Crê-se que este fenómeno deve-se ao facto do inóculo encontrar-se mais próximo da temperatura de fermentação ótima das leveduras, promovendo assim uma melhor performance fermentativa da levedura. Esta hipótese é suportada pela observação feita por Jenkins *et al.* (2011) em relação às LSA. O inóculo a 37°C apresentou uma fase de adaptação maior causando um arranque de fermentação tardio, com cerca de 2 horas de diferença do inóculo a 30°C. Esta ocorrência, no entanto, não afetou a taxa de consumo de substrato em que a duração da fermentação foi igual para ambas as temperaturas da solução standard.

Segundo Jenkins *et al.* (2011) a temperatura de rehidratação deve ser ajustada consoante o tipo de levedura e que ao sujeitar as leveduras a outras temperaturas, que não as

temperaturas ótimas, pode comprometer o sucesso das fermentações promovendo o abrandamento ou paragem de fermentações.

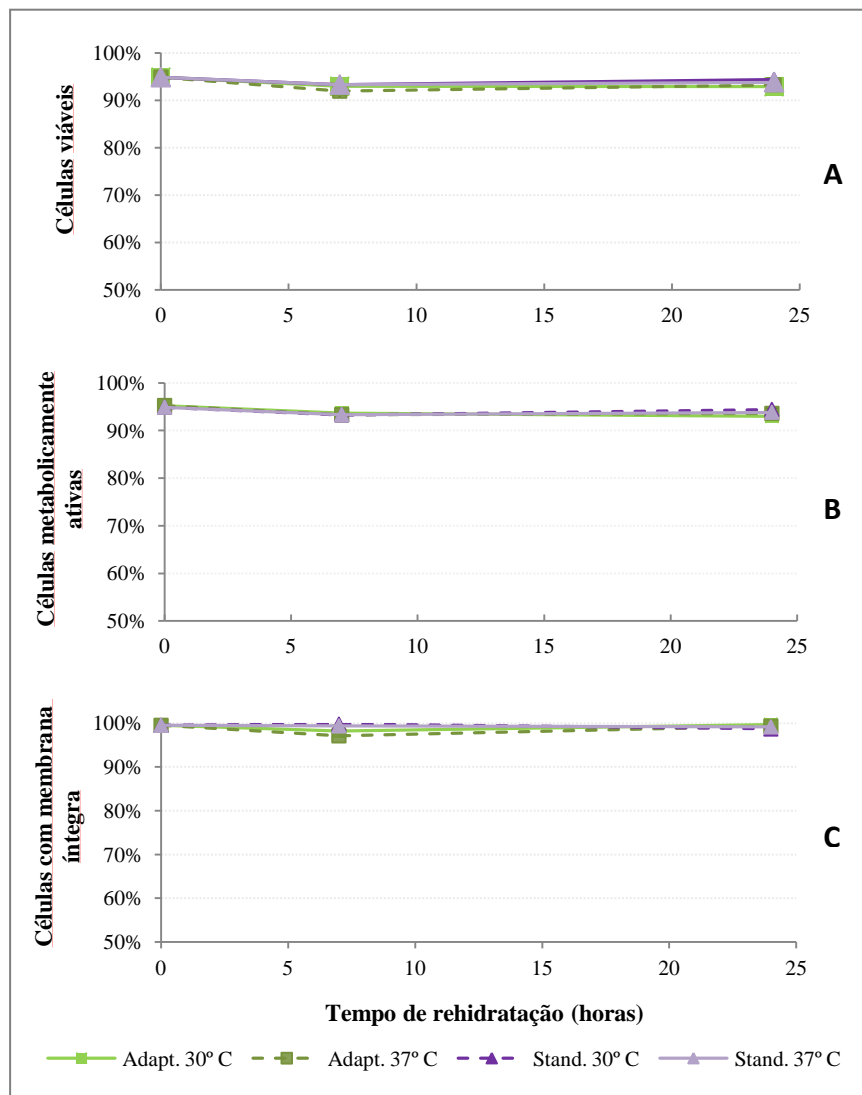
**Tabela 4** – Registo dos parâmetros das retas associados às taxas de consumo de açúcares redutores dos 4 ensaios de rehidratação, em relação às soluções adaptada e standard e respetivas temperaturas, a 30 e 37°C

Rehidratação	Declive da reta ( $\text{h}^{-1}$ )	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
Adaptada a 30°C	0,063	0,981
Adaptada a 37°C	0,053	0,989
Standard a 30°C	0,064	0,971
Standard a 37°C	0.063	0,985

No entanto, como os 4 ensaios experimentais apresentaram um desempenho fermentativo semelhante, tornou-se difícil identificar a melhor temperatura de rehidratação. Deverão realizar-se novos estudos para melhor clarificar esta questão, recorrendo a ensaios réplicas e à medição de parâmetros adicionais, como a medição de  $\text{CO}_2$ .

#### 4.1.2.2 Análise da viabilidade e vitalidade celular na rehidratação

Um dos maiores problemas da rehidratação está relacionado com a mortalidade e a perda da vitalidade das células durante este processo. De forma a evitar que as membranas das células sofram alterações, que poderão ser letais para as leveduras, a rehidratação deve ser realizada de forma meticulosa seguindo o protocolo estipulado pelo produtor de levedura. Assim, será possível minimizar e até evitar danos estruturais, como perda da fluidez, das membranas nas células e assegurar uma melhor performance da levedura [Jenkins *et al.*, 2011]. Para determinar o estado fisiológico da célula foram feitas análises à viabilidade e vitalidade das células rehidratadas através da combinação de 2 fluoróforos, o iodeto de propídeo (IP) e o acetato de carboxifluoresceína (cFDA). Com o fluoróforo IP foi possível determinar a integridade das membranas das células e com o cFDA a atividade esterásica das células de levedura. Com a conjugação destes dois fluoróforos foi possível determinar as percentagens de células viáveis, ou seja, de células metabolicamente ativas e com membrana íntegra.



**Figura 8** – Percentagem de células viáveis (A), de células metabolicamente ativas (B) e de células com membrana íntegra (C), ao longo do ensaio de rehidratação, em soluções de rehidratação standard e adaptada a 30 e 37°C respetivamente

Observando a figura 8 verificou-se que as células de levedura perderam, aproximadamente, 2% de viabilidade e observou-se uma ligeira diminuição da população metabolicamente ativa ao longo do tempo, nos 4 ensaios. Em relação ao estado das membranas das células não houve comprometimento da integridade membranar em todos os ensaios de rehidratação, permanecendo este parâmetro praticamente constante ao longo do tempo.

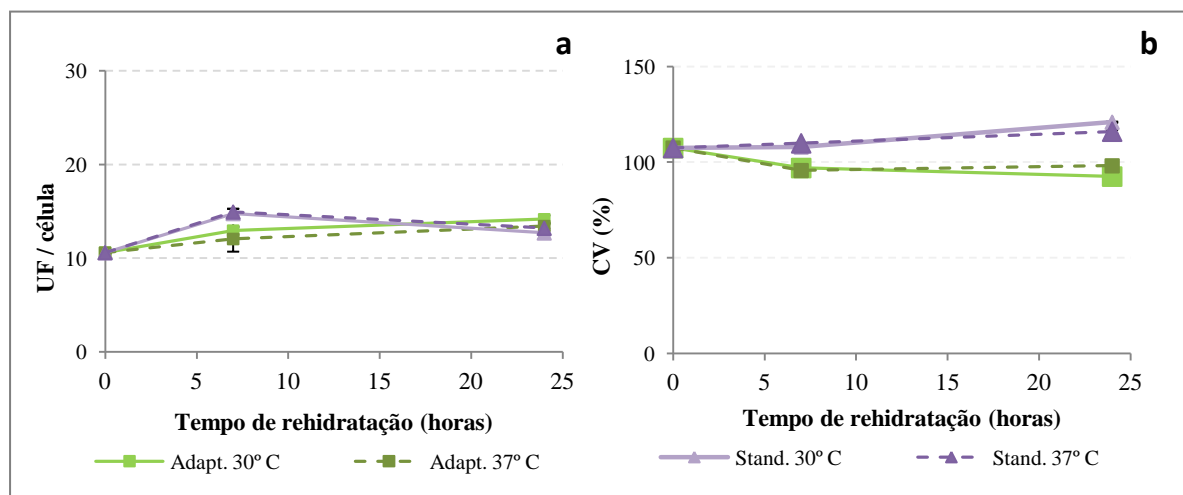
Em geral, as leveduras mantiveram-se com uma elevada viabilidade (> a 90%) após o consumo total de substrato, indicando que mesmo expostas a um meio com concentração residuais de açúcares, se mantêm viáveis, mantendo uma elevada população metabolicamente ativa e com uma boa integridade membranar.

É possível constatar que ambas as temperaturas não interferem no estado fisiológico das células quando avaliadas por citometria de fluxo. Assim sendo tornou-se difícil identificar a melhor temperatura de rehidratação, o que implica a necessidade de realizar mais ensaios e a utilização de outras técnicas que permitam clarificar esta questão.

#### 4.1.2.3 Análise da evolução de teores em lípidos neutros e em trealose na rehidratação

Os lípidos neutros e a trealose foram analisados com o objetivo de estimar os teores intracelulares das células de levedura, uma vez que fornecem informações importantes sobre o estado metabólico e o estado de adaptação das leveduras durante um processo fermentativo.

Um dos primeiros efeitos que a rehidratação causa nas células é a alteração da fluidez da membrana [Rodriguez-Porrata *et al.*, 2008]. Segundo Beker *et al.* (1984) ao longo da rehidratação, a membrana celular é rapidamente reparada devido à utilização dos teores intracelulares de lípidos neutros pelas células. Todavia, a maioria das leveduras não só utiliza os lípidos neutros como precursores, essenciais para a reestruturação das membranas, como poderá armazená-los como reserva de energia [Czabany *et al.*, 2007].

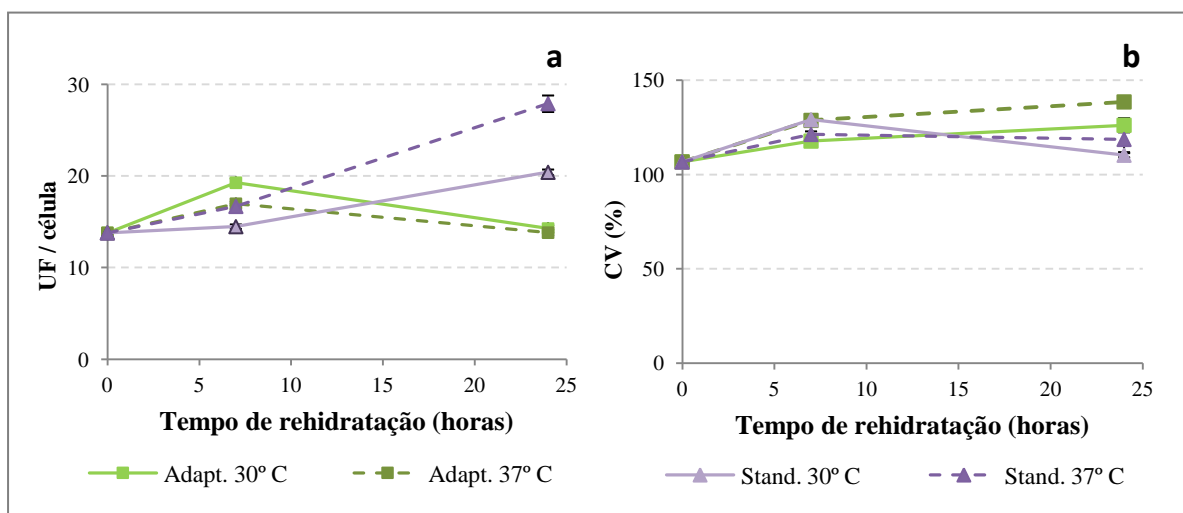


**Figura 9** - Evolução do teor em lípidos neutros ao longo da rehidratação das leveduras. **a** - Quantificação do teor em Unidades de Fluorescência média por célula; **b** – Evolução da heterogeneidade populacional medida pelo coeficiente de variância (CV)

Com base no que Beker *et al.* (1984) reportaram no seu artigo sobre LSA, esperava-se observar aqui também um consumo de lípidos neutros, na figura 8a. Esta ocorrência não foi observada e poderá ser justificada pelo fato de as leveduras, por se encontrarem imobilizadas numa dupla camada de alginato, terem uma maior resistência às condições de stress a que são sujeitas durante o processo de rehidratação. Assim sendo, não houve necessidade de reparação membranar, permitindo que as células acumulassem pequenas quantidades de lípidos neutros ao longo do tempo de rehidratação.

Na figura 9a, verifica-se que as células, sujeitas à solução adaptada, apresentam um comportamento diferente ao que era esperado. Ao contrário da solução standard, as células em solução adaptada encontravam-se em condições mais favoráveis para acumular maiores quantidades destes compostos. Porém, tal fato não se observou. Em ambas as soluções, independentemente das suas temperaturas, as leveduras apresentaram sempre o mesmo comportamento.

A trealose, é um dissacarídeo não redutor, importante para as leveduras. Desempenha várias funções essenciais para a sobrevivência das células em condições adversas, como a funcionalidade osmoprotetora durante as fermentações e em elevadas concentrações confere às leveduras maior osmotolerância, termotolerância e tolerância ao etanol. No entanto a trealose, só em última instância, é utilizada como fonte de energia. [Majara *et al.*, 1996] [Elbein *et al.*, 2003] [Aranda *et al.*, 2003] [Jules *et al.*, 2008] [Chlup, 2008].



**Figura 10** – Evolução do teor em trealose ao longo da rehidratação das leveduras. **a** - Quantificação do teor em Unidades de Fluorescência média por célula; **b** – Evolução da heterogeneidade populacional medida pelo coeficiente de variância (CV).

No gráfico a da figura 10 registou-se um aumento do teor em trealose nas células em solução standard, indicando que houve síntese e/ou acumulação de trealose por parte das leveduras. Wiemken (1990) argumenta contra esta observação, em que a trealose é acumulada inicialmente como fonte energética. Segundo o mesmo, a trealose só é sintetizada sob condições de privação de substrato e consumida muito tempo depois da depleção das reservas de hidratos de carbono.

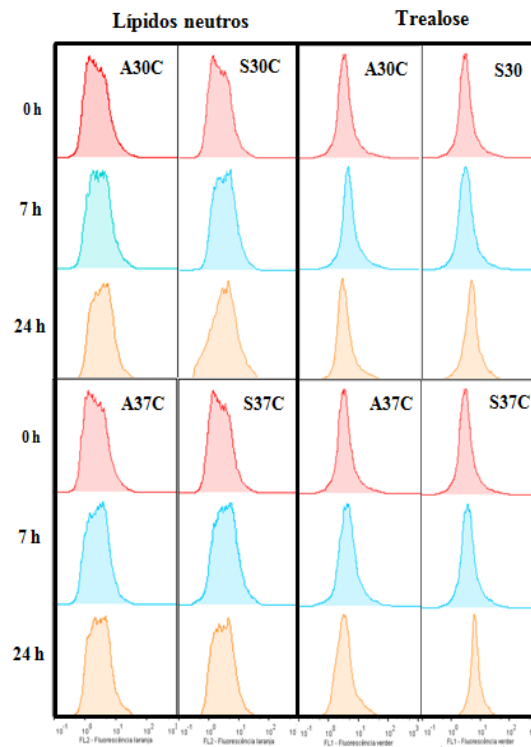
Contrariamente ao que era esperado, as LSE que se encontravam em condições mais favoráveis, devido à adição de suplementos nutritivos, não apresentaram um aumento considerável de teor em trealose.

A quantificação do teor em trealose por citometria de fluxo foi feita através da utilização de um reagente comercial com um fluoróforo específico cuja natureza da sua composição não é relevada pela empresa fornecedora, a Partec. Atualmente, a existência de referências com a utilização deste fluoróforo na literatura científica é praticamente inexistente, e na realidade, pouco se sabe sobre o papel deste dissacarídeo na fase de rehidratação das leveduras. No entanto, crê-se que este fluoróforo poderá ser a concanavalina A (ConA). Esta suposição baseia-se na única referência divulgada por Chlup *et al.* (2008), em que estes recorreram a este reagente para quantificar este composto em leveduras de cerveja. Segundo Worthington *et al.* (2013) a ConA poderá interagir com resíduos terminais de açúcares específicos sendo um fluoróforo útil para deteção de hidratos de carbono das células. Neste contexto, a ConA pode detetar trealose como qualquer outro hidrato de carbono, como  $\alpha$ -D-glucose e  $\alpha$ -D-mannose, não redutores, presentes na célula. Por tratar-se de um fluoróforo não específico e de não existir muita informação disponível sobre este, em relação às leveduras, pressupõe-se que este reagente influencia os resultados obtidos por citometria de fluxo. A ConA pode apresentar estimativas imprecisas de teores relacionadas com o excesso de intensidades de fluorescência emitidas. A hipótese de ser este o fluoróforo utilizado neste trabalho, pode explicar o facto de se ter obtido resultados incoerentes observados na figura 10.

Assim sendo os resultados obtidos referentes ao teor em trealose não estão de acordo com o que era esperado levantando a dúvida se de fato o reagente comercializado pela Partec não será o ConA. Desta forma, estes resultados não permitem estabelecer qualquer relação com as temperaturas e as soluções de rehidratação testadas neste estudo por citometria de

fluxo sendo necessário realizar mais ensaios e recorrer a outros métodos de análises para suportar esta hipótese.

Para analisar os teores em lípidos neutros e em trealose, foram tidas em conta as heterogeneidades das populações. Os histogramas da figura 11, obtidos através do programa *FlowJo*, ilustram as variações na dispersão de fluorescência correspondentes à diversidade populacional. No caso dos teores em lípidos neutros, observou-se que a população apresenta uma grande dispersão de fluorescência laranja (FL2), indicando a existência de uma grande heterogeneidade de teores em lípidos neutros na população. Relativamente à heterogeneidade da população, observou-se uma ligeira variação da heterogeneidade quando comparadas as soluções. Comparativamente às temperaturas das soluções verificou-se que a variação era inexistente (ver figura 9b). Quanto ao teor em trealose, foram observadas ligeiras variações na dispersão de fluorescência verde (FL1), reflexo de um aumento da heterogeneidade da população quanto aos seus teores (ver gráfico 10b).



**Figura 11** - Análise comparativa de histogramas representativos dos teores em lípidos neutros (FL2) e em trealose (FL1) obtidos por citometria de fluxo e tratados pelo software FlowJo, para os 3 tempos de recolha de amostras de esferas (0, 7 e 24 horas) e as 4 soluções de rehidratação. **A30C** – rehidratação adaptada a 30° C; **A37C** – rehidratação adaptada a 37° C; **S30C** – rehidratação standard a 30° C e **S37C** – rehidratação standard a 37° C

## 4.2 Ensaio de inoculação

O ensaio designado por ensaio de inoculação teve como objetivo avaliar o efeito da rehidratação ou da sua ausência na capacidade fermentativa e na fisiologia das células de levedura quando inoculadas em vinho. Sendo assim, testaram-se 3 protocolos de inoculação: inoculação direta (ensaio 1); inoculação com rehidratação adaptada (ensaio 2) e inoculação com rehidratação standard (ensaio 3).

A rehidratação das LSE é considerada um processo muito importante para a recuperação funcional das leveduras. No entanto, a performance das leveduras depende das condições do novo meio quando são inoculadas. Um dos parâmetros testados no ensaio da rehidratação foi a permanência das leveduras em solução de sacarose durante um período de tempo prolongado. Com base nos resultados obtidos no estudo anterior, estipulou-se que o tempo de rehidratação seria de 18 horas dado que se trata de um período satisfatório para recuperação funcional das células, em que o meio permanece com 15% de substrato e as células se apresentam ainda com uma boa viabilidade e vitalidade (ver figura 5). Não seria adequado definir o tempo de 24 horas dado que as leveduras, nesse período, estariam privadas de substrato e sob condições de stress, podendo assim vir a comprometer as performances destas quando inoculadas em vinho. Para cada ensaio houve monitorização da cinética fermentativa e foram feitas análises à viabilidade e vitalidade das células de leveduras do lote E21. A dose de ProElif® aplicada foi superior à dose normalmente inoculada em fermentações em garrafas para acelerar o processo de fermentação de modo a obter resultados num tempo mais curto. A fermentação decorreu até o açúcar residual ser consumido.

Com o objetivo de definir os tempos ideais para a recolha de amostras de esferas foi realizado um ensaio preliminar. O ensaio consistia na inoculação direta de leveduras em vinho base e foi dado como terminado após o consumo total de substrato. Uma vez concluído este ensaio, verificou-se que a duração da fermentação era de 183 horas (7,6 dias). Por ser um período longo, foi estabelecido que os pontos de recolha de amostras de esferas seriam definidos com base no consumo de substrato (açúcares redutores) e não no tempo de fermentação. Este método foi escolhido por causa das diferenças apresentadas nas performances fermentativas das leveduras quando inoculadas com os 3 protocolos selecionados para este estudo. Dadas as circunstâncias, foi pressuposto que as leveduras quando inoculadas em vinho adotaram comportamentos distintos no tempo devido às



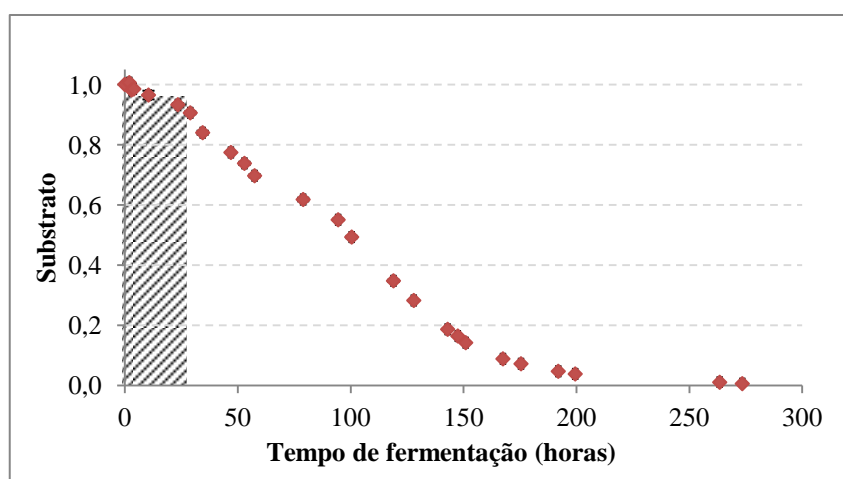
diferentes condições de cada fermentação. Sendo assim foram selecionados 7 pontos de amostragem correspondentes a 7 situações cruciais da fermentação, nomeadamente a 7 percentagens de consumo de substrato nas 3 fermentações (tabela 5). Adicionalmente foi selecionada mais uma recolha de amostra de esferas em que as leveduras permaneceram no vinho durante mais uma semana. Desta forma foi possível avaliar o estado fisiológico das leveduras dos 3 ensaios após um longo período de privação de açúcares.

**Tabela 5** – Registo dos pontos de amostragem de esferas em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

Pontos de amostragem	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Consumo de substrato (%)	0	5-10	20-35	40-70	80-90	90-95	95-100

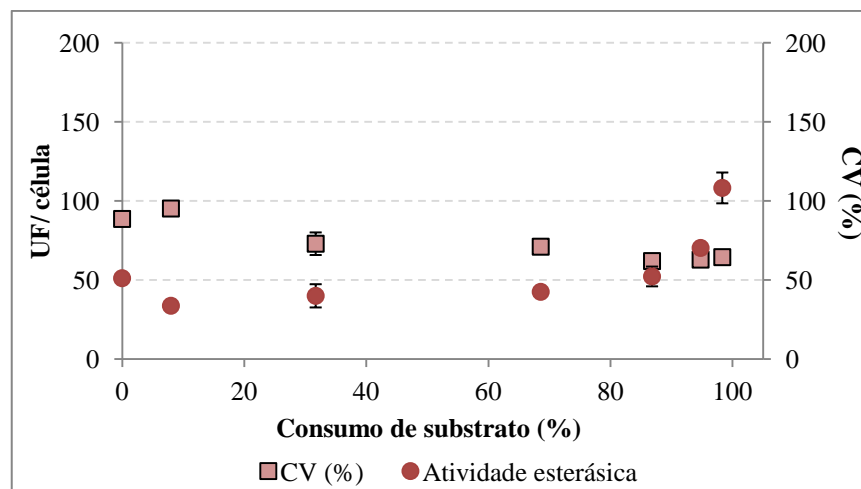
#### 4.2.1 Ensaio 1: Ensaio com inoculação direta (ID) das leveduras em vinho

A duração da fermentação das leveduras inoculadas diretamente em vinho base, sem rehidratação prévia, foi de 273 horas (11,4 dias). As leveduras quando inoculadas no vinho, apresentaram uma fase de adaptação, designada por fase *lag* que teve a duração de 29 horas (1,2 dias). Verificou-se que, nos primeiros instantes na figura 12, a taxa de consumo de substrato em ID é reduzida, promovendo uma fase de arranque da fermentação lenta. Esta constatação era esperada, uma vez que as leveduras necessitam de um tempo de adaptação ao meio fermentativo, enquanto se encontram na fase de rehidratação.



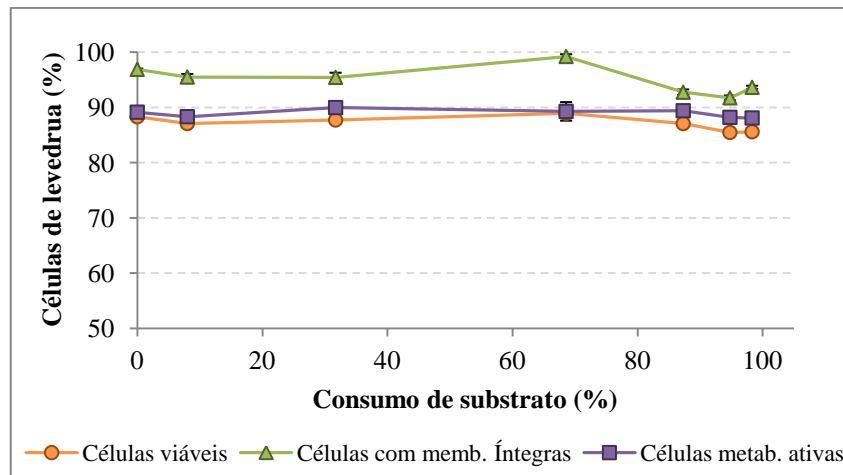
**Figura 12** – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas diretamente sem rehidratação prévia (ID) em vinho base, à temperatura de 18°C. Fase *lag* (▨ )

Através da figura 13, é possível observar a relação existente entre a reativação da atividade esterásica e o período de adaptação que as leveduras necessitaram antes de consumirem o substrato, observado na figura 12. Quanto maior for o período de adaptação, maior é o tempo de reativação metabólica das leveduras e, conseqüentemente, mais difícil o arranque das fermentações. Assim, verificou-se que as células de leveduras em ID tiveram um arranque de fermentação mais lento, com uma taxa de consumo reduzida ou nula, devido à necessidade de requerem mais tempo para se adaptarem às condições do meio.



**Figura 13** – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas diretamente em vinho base (ID), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares)

A figura 13 permite avaliar a heterogeneidade da população de leveduras ativas metabolicamente, pela variação percentual do CV. Nos primeiros instantes, correspondentes ao período de adaptação das células ao meio, observou-se que há uma diminuição de atividade e um ligeiro aumento da heterogeneidade populacional. Uma vez adaptadas às condições do meio, observaram-se um aumento gradual da atividade esterásica que se traduziu num aumento da taxa de consumo de açúcar e por outro lado uma pequena variação da heterogeneidade da população. Com o aumento gradual da atividade esterásica, a população de células reduz a dispersão da intensidade de fluorescência, obtendo variações de intensidades uniformes.

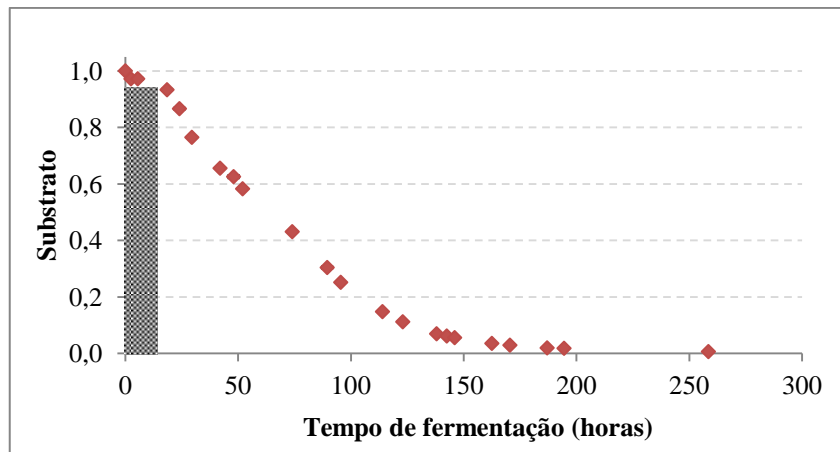


**Figura 14** - Evolução do estado fisiológico das células de levedura quando inoculadas diretamente em vinho (ID), quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

A análise gráfica da figura 14 caracteriza o estado fisiológico das leveduras quanto à sua viabilidade e vitalidade, durante a fermentação, face ao consumo de substrato pelas células de levedura. É possível concluir que as leveduras não sofrem uma perda de viabilidade e de vitalidade durante as 250 horas (10,5 dias) de fermentação. Apresentaram-se sempre com uma elevada percentagem de células com membrana íntegra, uma população metabolicamente ativa sempre constante e uma elevada percentagem de células viáveis. Como referido no ponto 4.7.2, as leveduras continuaram no meio fermentativo mais uma semana, após consumo total de açúcar. Passada essa semana, foram feitas análises às leveduras e observou-se o que era esperado, uma perda de viabilidade e de vitalidade. As leveduras, nesse período, perderam aproximadamente 20% de células viáveis, 13% de integridade membranar e 15% de células metabolicamente ativas.

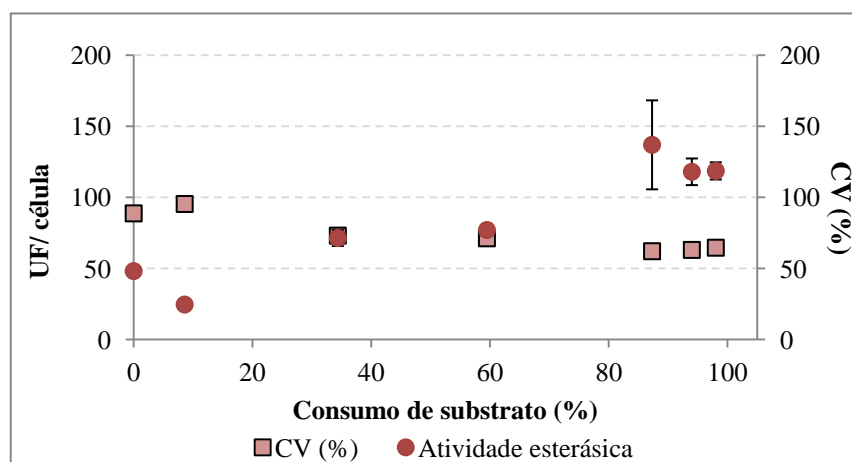
#### 4.2.2 Ensaio 2: Ensaio com inoculação com rehidratação standard (IRS) das leveduras em vinho

O tempo de fermentação das leveduras rehidratadas com a solução standard foi de 259 horas (10,8 dias) e a fase de adaptação das leveduras ao meio fermentativo teve a duração de 18,5 horas (0,77 dias).



**Figura 15** – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas com rehidratação standard (IRS) em vinho base, à temperatura de 18°C. Fase lag (■)

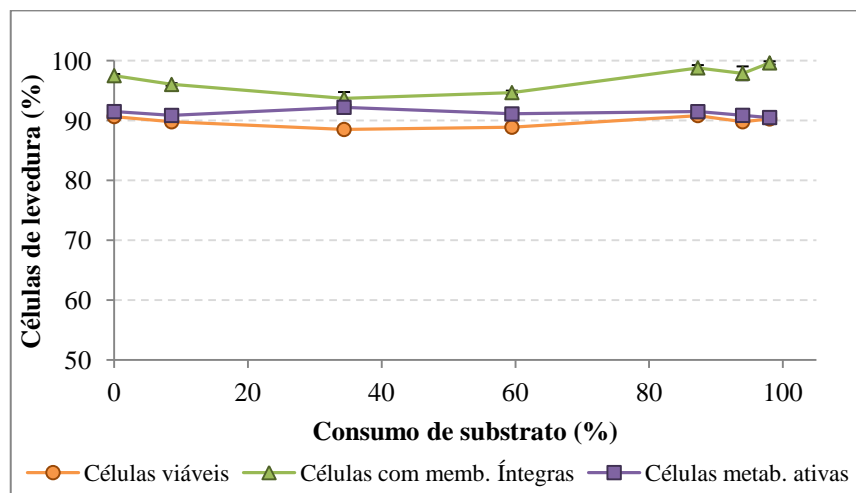
As leveduras antes de inoculadas em vinho foram sujeitas a uma rehidratação prévia, segundo o protocolo de rehidratação standard (ponto 2.1.5). O processo de rehidratação permitiu reativar o metabolismo das leveduras, reduzindo assim a fase de adaptação ao meio fermentativo (ver figura 15).



**Figura 16** – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas com rehidratação standard (IRS), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

Na análise à figura 16, observou-se que as leveduras mesmo rehidratadas previamente perdem atividade esterásica e que continuam a necessitar de uma fase de adaptação ao meio. Face ao arranque da fermentação, verificou-se um aumento de atividade esterásica até o consumo total do substrato. Após 80% de substrato consumido, a atividade esterásica

das leveduras é máxima mas com a escassez de açúcares no meio fermentativo as células reduzem gradualmente a sua atividade como resposta de sobrevivência. A população de leveduras apresentou uma redução gradual na dispersão de fluorescência ao longo da fermentação. Isto deve-se ao fato de que as células começam a emitir uma intensidade de fluorescência mais uniforme que se refletiu nos valores percentuais de CV constantes obtidos.

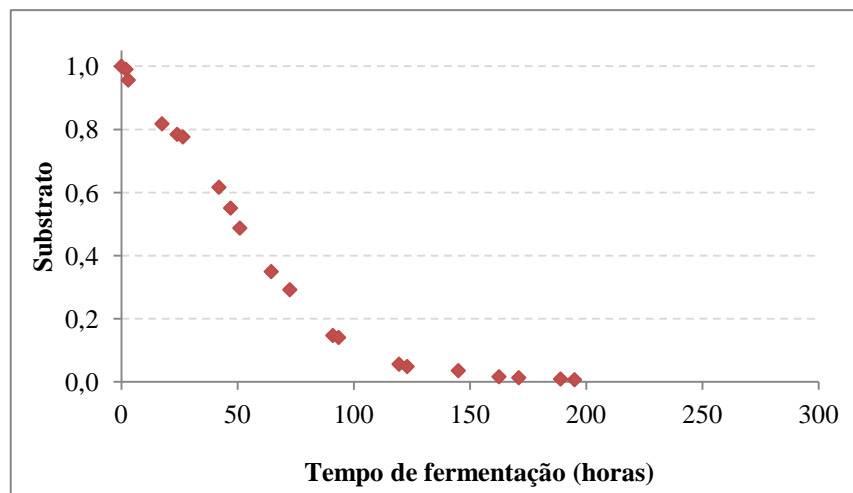


**Figura 17** - Evolução do estado fisiológico das células de leveduras quando inoculadas com rehidratação standard (IRS) em vinho, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

Observou-se na figura 17 que as leveduras mesmo com rehidratação prévia apresentaram um bom estado fisiológico, ao longo da fermentação. Num período de 200 horas (8,3 dias), observou-se uma ligeira perda de integridade membranar mas que é recuperada até ao fim da fermentação. Quanto às percentagens de células viáveis e de células metabolicamente ativas não foram observadas variações durante todo o ensaio fermentativo. Após uma semana do fim da fermentação, as leveduras apresentaram-se com uma perda de 14,9% de células viáveis, 10,8% de células metabolicamente ativas e 10,5% de células com membrana íntegra. Este fenómeno está de acordo com o esperado, dado que as leveduras encontraram-se privadas de substrato e em condições difíceis durante um período de tempo de 168 horas (7 dias).

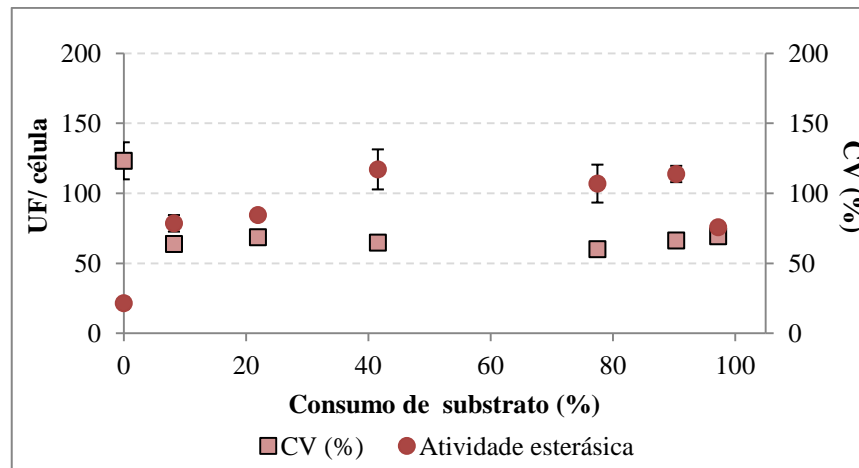
#### 4.2.3 Ensaio 3: Ensaio com inoculação com rehidratação adaptada (IRA) das leveduras em vinho

As leveduras rehidratadas com a solução de rehidratação adaptada apresentaram um melhor desempenho fermentativo. O tempo de fermentação foi bastante rápido, tendo as leveduras consumido o substrato praticamente em 195 horas (8,1 dias). Após a rehidratação das células com a solução adaptada e a sua inoculação em vinho verificou-se que estas não necessitaram de uma fase de adaptação longa, iniciaram de imediato a fermentação (figura 18).



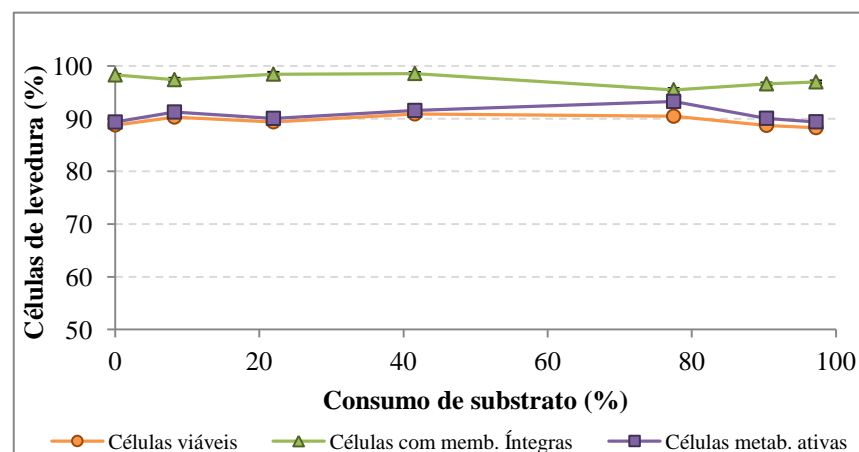
**Figura 18** – Evolução do consumo de substrato (açúcares redutores) das leveduras quando inoculadas com rehidratação adaptada (IRA) em vinho base, à temperatura de 18°C

Com um arranque fermentativo rápido e com uma reduzida fase de adaptação, as células reativaram rapidamente os seus metabolismos. Desta forma, a performance fermentativa das células foi muito boa, consumindo rapidamente o substrato. Através da figura 18, verifica-se que com a escassez do substrato as células reduzem de forma gradual a sua atividade metabólica como resposta de sobrevivência.



**Figura 19** – Evolução da atividade esterásica das células de levedura quando inoculadas com rehidratação standard (IRA), expressa em Unidades de Fluorescência média por célula com a heterogeneidade populacional das leveduras, expressa em valores percentuais do coeficiente de variância (CV), em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

Relativamente à heterogeneidade da população verificou-se, na figura 19, que as células quando inoculadas em vinho apresentavam elevado CV face à baixa atividade esterásica. Quer isto dizer que a população celular quando inoculada apresentava várias intensidades de fluorescência, ou seja, havia uma grande heterogeneidade populacional. Uma vez que as células foram rapidamente reativadas, a dispersão das intensidades foi reduzida rapidamente e a heterogeneidade não sofreu mais alterações até o consumo total de substrato.



**Figura 20** - Evolução do estado fisiológico das células de leveduras quando inoculadas com rehidratação adaptada (IRA) em vinho, quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas íntegras, em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

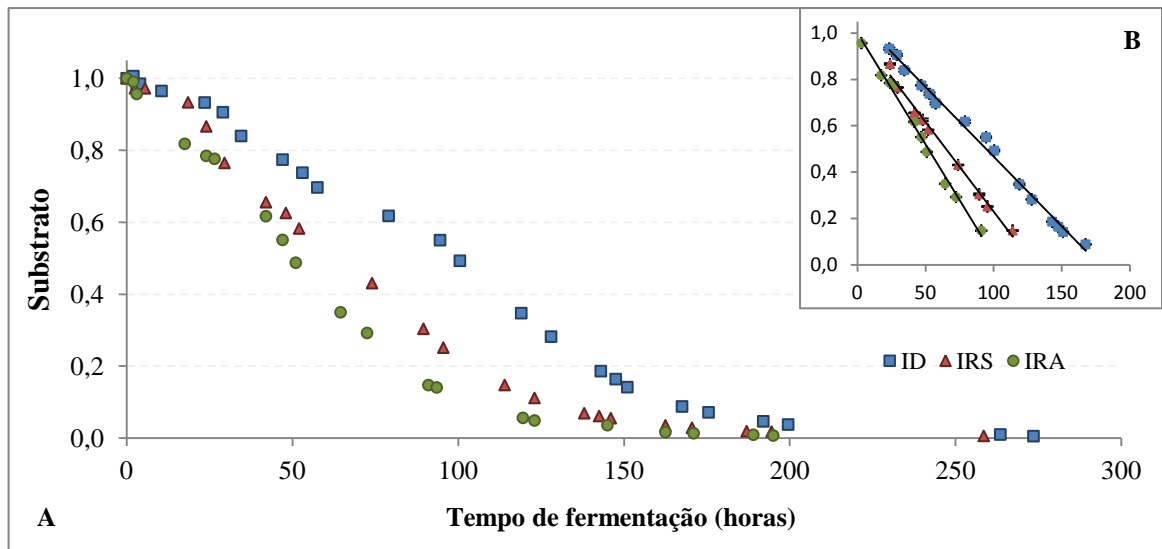
Na análise à figura 20, verificou-se que a solução de rehidratação adaptada influenciou o desempenho das leveduras protegendo-as das condições adversas da fermentação. Constatou-se também que as leveduras ao longo do tempo de fermentação e até mesmo depois de privadas de substrato, após 168 horas (7 dias), se apresentaram com um bom estado fisiológico. As perdas sofridas não foram significativas quanto às percentagens de células viáveis, de células metabolicamente ativas e de células com membranas ativas. Os resultados obtidos estão de acordo com o que era esperado e comprovam a ideia de que a solução adaptada é benéfica para as células e deve ser aplicada industrialmente. Todavia, ainda requer a realização de ensaios de fermentação em garrafa, para validar o protocolo de inoculação com rehidratação adaptada, das leveduras em vinho.

#### **4.2.4 Comparação das cinéticas fermentativas das fermentações com diferentes tipos de inoculação**

A fermentação alcoólica é conhecida por ser um processo lento, principalmente na sua fase de arranque onde há um período de adaptação das leveduras às condições do meio, do qual se pretende que seja o mais curto possível. Atualmente, os produtores de vinhos exigem cada vez mais que as estirpes de leveduras promovam processos de fermentação rápidos e repetíveis para a obtenção de vinhos com o mesmo padrão de qualidade e de características organoléticas. De forma a poder garantir essas exigências é necessário avaliar a performance fermentativa das leveduras em vinho através da determinação da cinética fermentativa. A cinética fermentativa depende de vários fatores, entre os quais o estado fisiológico e as condições físico-químicas do vinho base. Pode ser determinada por diferentes parâmetros: 1) pelo início de fermentação lento, associado à duração da fase *lag* e a uma taxa de consumo de açúcares reduzida ou nula; 2) pelo período de tempo necessário para consumo total de açúcares; e 3) pela velocidade da taxa de consumo de açúcares [Jackson, 2000].

Na figura 21A podem observar-se as cinéticas de fermentação, conduzidas a uma temperatura de 18°C, dos 3 ensaios de inoculação (ID, IRS e IRA) utilizados para este estudo.





**Figura 21** – Evolução do consumo de substrato das leveduras quando inoculadas diretamente sem rehidratação prévia (ID), inoculadas com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em vinho base, à temperatura de 18°C (A). Linearizações para determinação das taxas de consumo de açúcares redutores (B)

Tendo em conta os resultados obtidos verificou-se um início de fermentação lento, para o ID e IRS, ao contrário do IRA. Uma vez iniciada a fermentação, em todos os ensaios, constatou-se que os açúcares foram degradados de forma regular, apresentando um consumo quase constante até ao final do processo. No entanto, o tempo e a taxa de fermentação é diferente para cada ensaio. Para o ensaio 1, com inoculação direta (ID), a fase *lag* foi a mais longa (29 horas) e o tempo de fermentação foi muito lento, com cerca de 273 horas (11,4 dias). A fermentação correspondente à inoculação com rehidratação standard (IRS) apresentou uma fase *lag* curta (18,5 horas) e uma cinética fermentativa ligeiramente mais rápida. Relativamente à inoculação com rehidratação adaptada (IRA) a fase *lag* é mesmo muito curta (1 hora) e o tempo de fermentação foi o mais rápido dos 3 ensaios, com diferença de 78 horas (3,3 dias). Outra constatação curiosa que se verifica é que o ensaio IRS teve um final de fermentação lento. No entanto, devido à inexistência de amostras nesse período, das 200 às 250 horas, e pelo fato de que o limite mínimo de análise de açúcares redutores, no aparelho do ABX Pentra 400, ser de 0,25 g/L não foi possível assumir que a fermentação abrandou realmente durante esse tempo. Esta até poderá ter terminado na mesma altura que o ensaio IRA, mas devido ao erro associado à medição dos açúcares não é possível ter a certeza.

Para a determinação da taxa de consumo, linearizaram-se os pontos experimentais depois da fase *lag*, permitindo quantificar a velocidade de consumo de açúcares através dos respetivos declives (ver figura 21B).

**Tabela 6** – Registo dos parâmetros das retas associados às velocidades de consumo de açúcares redutores dos 3 ensaios de inoculação: ensaio 1 (ID), ensaio 2 (IRS) e ensaio 3 (IRA) durante a fermentação

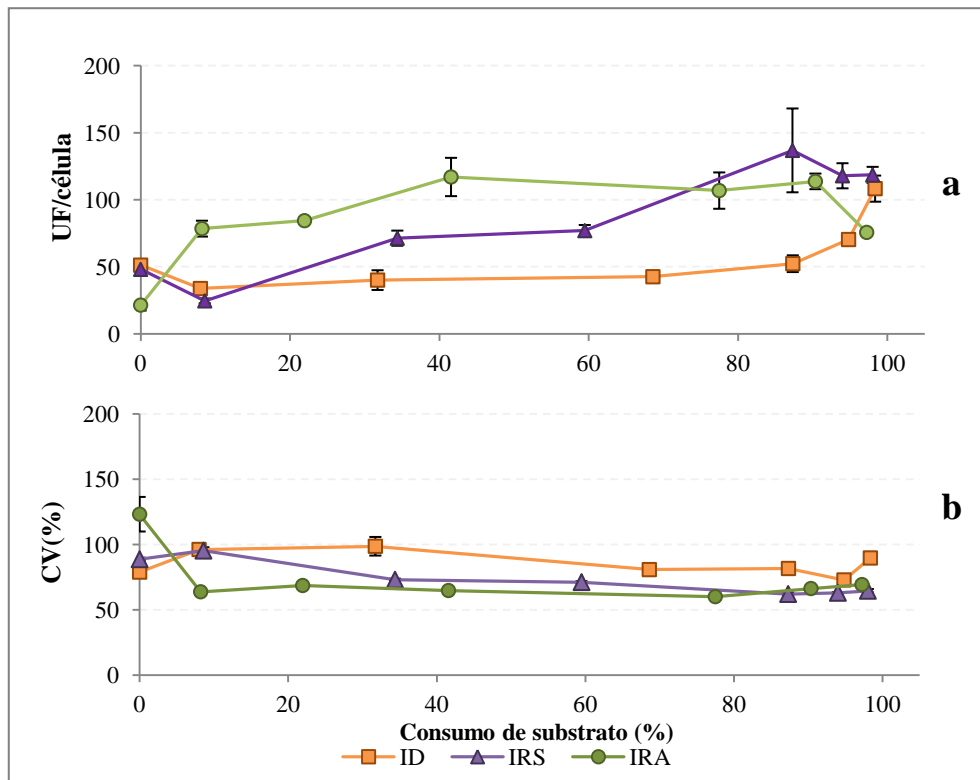
Ensaio	Declive da reta (h <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação (r <sup>2</sup> )
Ensaio 1 (ID)	0,00601	0,994
Ensaio 2 (IRS)	0,00805	0,987
Ensaio 3 (IRA)	0,00961	0,993

Analizando os declives das retas da tabela 6, ou seja, analisando as taxas de consumo de substrato verificou-se que as esferas com rehidratação prévia (IRA e IRS) promoveram fermentações que foram 1,6 e 1,3 mais rápidas do que as esferas sem rehidratação (ID). Para além disso, verificou-se que mesmo inoculadas com rehidratação prévia as leveduras em IRS apresentaram uma fase *lag* maior que as das leveduras em IRA. Isto mostra que para além de a rehidratação reduzir a fase *lag*, a composição da solução de rehidratação utilizada determina a eficiência da fermentação.

Concluiu-se assim, que a rehidratação prévia das esferas é benéfica para se obterem fermentações mais rápidas e que a adaptação feita na solução de rehidratação teve um efeito positivo na fermentação, que se traduziu num rápido arranque da fermentação e na maior velocidade de fermentação obtendo-se consequentemente uma redução do tempo de fermentação. De um ponto de vista económico, a obtenção de uma redução do tempo de fermentação é um fator importante especialmente para produtores que comercializam o vinho espumante imediatamente após a segunda fermentação. Estes são os casos em que os vinhos espumantes não se enquadram nas denominações de origem por não cumprir com os requisitos mínimos exigidos.

#### 4.2.5 Comparação de atividades esterásicas das LSE com diferentes tipos de inoculação

A atividade esterásica é determinada pela quantidade de enzimas esterásicas não específicas presentes nas células de leveduras quando incubadas pelo fluoróforo cFDA. Através da medição da fluorescência emitidas por estas enzimas foi possível recolher várias informações, que permitem determinar o comportamento das células num determinado momento e inferir as condições a que as mesmas estão sujeitas.

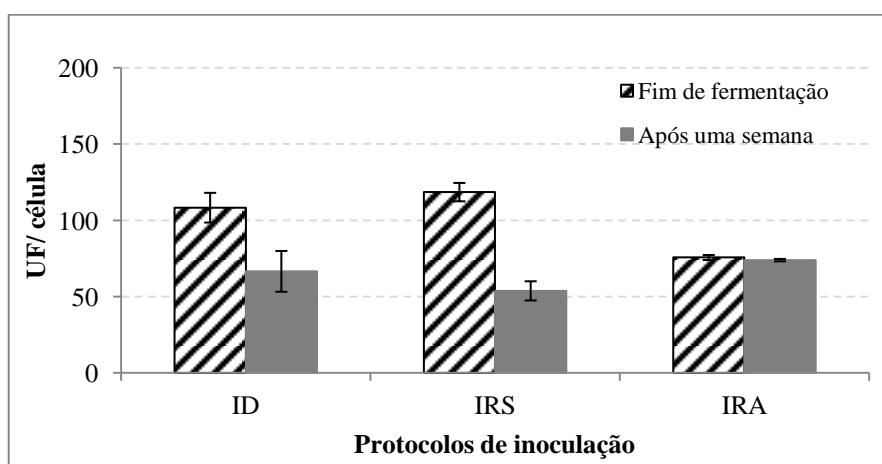


**Figura 22** - Evolução da atividade esterásica das células de leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores). **a:** expressa em UF/ célula, das leveduras em ID, IRS e IRA. **b:** expressa em valores percentuais de coeficiência de variância, das leveduras em ID, IRS e IRA

Ao comparar os resultados obtidos nas figuras 21 e 22a foi possível estabelecer uma relação entre a cinética fermentativa e a atividade esterásica, responsável pelos diferentes desempenhos fermentativos das LSE. As esferas quando inoculadas com rehidratação prévia arrancam a fermentação mais rapidamente que quando inoculadas diretamente. Além disso, presenciou-se um consumo de substrato com baixa atividade esterásica na IRA

em relação aos restantes ensaios mas que rapidamente essa tendência é contrariada com um aumento da atividade devido ao arranque rápido da fermentação. No entanto, observou-se que as células ao chegarem ao máximo da sua atividade muito rapidamente tendem, de seguida, a reduzir gradualmente a sua atividade consoante o consumo de substrato. Uma vez consumido todo o substrato, crê-se que as células em IRA e IRS reduzem a sua atividade esterásica como resposta adaptativa, conduzindo o seu metabolismo à melhor forma de se adaptar às difíceis condições em que se encontram. Para a IRS e a ID, presenciou-se um abrandamento das atividades esterásicas após a inoculação em vinho, em que as leveduras apresentaram um comportamento de adaptação lento e um arranque fermentativo tardio. Quanto à atividade esterásica do ID verificou-se que as células só aumentaram a sua atividade no fim da fermentação, pois durante a mesma manteve-se sempre baixa. Isto poderá indicar que as leveduras mantiveram sempre uma atividade reduzida para se adaptarem melhor às condições adversas do meio fermentativo. Devido à escassez de açúcares certamente as leveduras foram obrigadas a aumentar a sua atividade esterásica como resposta de sobrevivência.

Numa segunda análise ao gráfico b da figura 22, foi possível observar 3 populações distintas sem variações de heterogeneidades. Embora, as leveduras em IRA tivessem uma redução de heterogeneidade, todas as leveduras apresentaram CV constantes indicando que a dispersão das intensidades de fluorescências foi uniforme ao longo das fermentações.



**Figura 23** – Evolução da atividade esterásica, expressa em UF/célula, das células de leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) no fim da fermentação e após uma semana do fim de fermentação

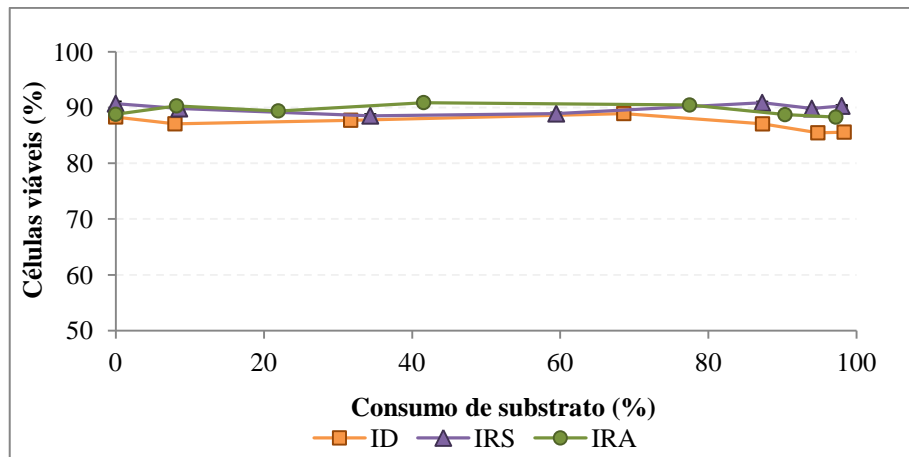
Como era esperado, as leveduras que estiveram privadas de substrato durante 168 horas (7 dias), sofreram uma perda de atividade, salvo no ensaio 3 (IRA). Na figura 23, observou-se que a resposta adaptativa adotada pelas células em reduzir a sua atividade perante a escassez de substrato no meio é importante para preservar o estado fisiológico das células. Esta ocorrência permite que a percentagem de células viáveis se mantenha elevada mesmo quando privadas de substratos e sujeitas às condições adversas da fermentação alcoólica. Esta observação conjugada com os resultados da figura 22 validam a preferência para a escolha da IRA como o melhor protocolo de rehidratação a usar em fermentações em vinho com LSE.

#### **4.2.6 Comparação de viabilidade e vitalidade das LSE com diferentes tipos de inoculação**

Na indústria vinícola, as leveduras têm que apresentar certas características que permitem a sua adaptação e finalização de fermentações alcoólicas [Zuzuaregui *et al.*, 2006].

Precisamente por essa razão recorreu-se à técnica de citometria de fluxo para avaliar o estado fisiológico e prever o desempenho destas em fermentações tanto laboratoriais como industriais. Através desta técnica e da conjugação de fluoróforos, o cFDA e o IP, é possível ultrapassar as limitações das determinações de viabilidade, em especial o método de azul de metileno, e introduzir o conceito da vitalidade. Assim, é possível detetar estados fisiológicos intermédios das células e evitar a inoculação de lotes de leveduras com reduzida percentagem de células viáveis e com elevada percentagem de células inativas ou de células moribundas, identificadas na literatura como células ativas metabolicamente mas com membranas comprometidas.

Hoje em dia, a nível industrial, o estado fisiológico das LSE é monitorizado durante e após a sua produção. Já foram realizados vários estudos sobre o performance das LSE quando inoculadas diretamente em vinho, mas nunca foram realizados estudos sobre o efeito da rehidratação sobre as LSE. A rehidratação é a fase mais crítica do processo fermentativo. Precisamente, por essa razão que se avaliou o estado fisiológico da viabilidade e vitalidade das células de leveduras comparando os três ensaios realizados com rehidratação e com a ausência de rehidratação das esferas de ProElif® em vinho base.



**Figura 24** – Percentagem de células viáveis das leveduras quando inoculadas sem rehidratação prévia (ID) e com rehidratação standard (IRS) e adaptada (IRA) em relação ao consumo de substrato (açúcares redutores)

No gráfico da figura 24 pode observar-se que as leveduras, em todos os ensaios, apresentaram uma elevada percentagem de células viáveis, até ao consumo total de açúcares. No entanto, foi possível observar que as leveduras em ID perdem viabilidade e vitalidade, numa fase final da fermentação, o que se traduz num fim de fermentação mais difícil. Ao contrário das leveduras rehidratadas que se apresentaram sempre com elevada percentagem de células viáveis até ao consumo total de substrato. Isto indica, que nenhum dos protocolos influencia a viabilidade e vitalidade das células durante a fermentação e que as LSE estão adaptadas às condições de fermentação alcoólica.

Assim, com valores constantes de percentagem de células viáveis em ambos os protocolos de rehidratação constatou-se que a rehidratação de LSE deve ser uma etapa a ser considerada para as reinoculações de LSE em fermentações paradas de espumantes. Constatou-se ainda que a solução adaptada utilizada neste trabalho é eficaz, ao promover uma melhor adaptação das células às condições adversas do meio fermentativo e maiores eficiências de fermentação. O suplemento nutritivo (Go-Ferm Protect) deve ser aplicado a nível industrial às soluções de rehidratação para LSE.

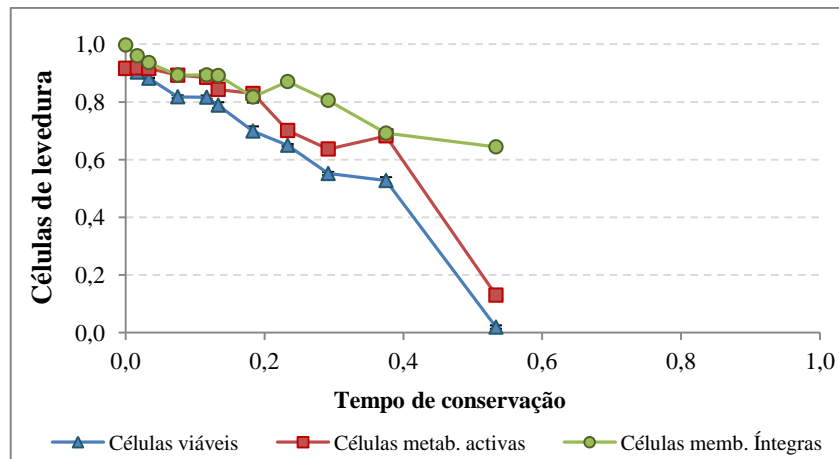
### **4.3 Ensaio de conservação**

A conservação das leveduras a baixas temperaturas permite preservar a qualidade comercial do produto durante um ou mais anos, onde as mesmas reduzem a sua atividade metabólica e as suas perdas de viabilidade e vitalidade. Assim, é preferível armazená-las a baixas temperaturas até serem utilizadas, sendo posteriormente necessário deixá-las a aclimatizar à temperatura ambiente antes de serem inoculadas.

De maneira a poder compreender o efeito das temperaturas de conservação nas leveduras foram realizados vários ensaios experimentais, onde se avaliou o estado fisiológico das leveduras de ProElif® a diferentes temperaturas. Neste estudo avaliou-se a conservação de 3 lotes em 3 condições de temperatura distintas e em condições de embalagem idênticas às do produto fabricado pela Proenol. As temperaturas selecionadas para este estudo foram A, B e C. Antes de ter-se iniciado o estudo, as leveduras selecionadas tinham sido produzidas em dias diferentes, tendo-se mantido conservadas à temperatura de conservação A. Para cada caso foram determinadas as viabilidades e vitalidades celulares e quantificados os teores em lípidos neutros e em trealose nas leveduras. O tempo de ensaio foi dado como terminado quando as células de levedura atingiram a percentagem de células viáveis pré-determinada (não discriminada) que é representada como zero.

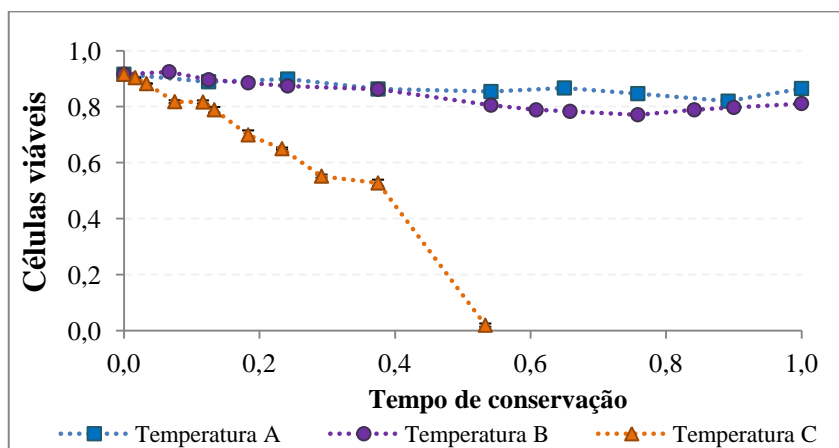
#### **4.3.1 Ensaio 1: Lote E21**

Feita uma análise aos resultados obtidos do lote E21 (não mencionados) observou-se que as perdas de viabilidade e vitalidade foram mínimas, no fim do ensaio de conservação à temperatura A. Quando conservadas à temperatura B, verificou-se que as leveduras tiveram uma perda gradual de viabilidade e vitalidade, cerca do dobro do apresentado pelas leveduras em A. No entanto, no fim do estudo apresentavam ainda elevadas percentagens de viabilidade e de vitalidade.



**Figura 25** – Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21 à temperatura de conservação C, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra ao longo do ensaio de conservação

Pela observação da figura 26 verificou-se que as leveduras conservadas à temperatura C perderam vitalidade muito rapidamente mas que a integridade membranar sofreu perdas menores. Quer isto indicar que houve um aumento substancial de percentagem de células inativas e que será uma questão de tempo até que as membranas se encontrem comprometidas. Uma vez exposta a sua estrutura interna ao meio ambiente as células acabarão por se decompor, sendo conduzidas à morte celular.

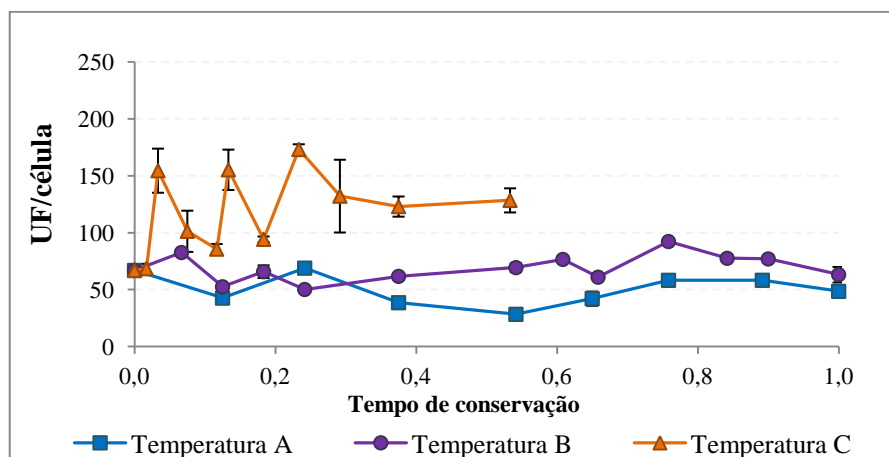


**Figura 26** – Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21, relativamente às células viáveis, das leveduras da amostra E21 nas 3 temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação



Com base nos dados experimentais da figura 27, quanto à percentagem de células viáveis de leveduras, constatou-se que as leveduras quando conservadas à temperatura A e B não sofreram alterações fisiológicas, ao contrário das células sujeitas à temperatura de conservação C, onde se verificou que as leveduras atingiram a percentagem de células pré-determinada num tempo de conservação de 0,53. Este fenómeno era esperado, pois quanto mais alta for a temperatura de conservação maior será a instabilidade fisiológica das leveduras que se traduz num aumento das percentagens de células metabolicamente inativas e de células com membrana comprometida.

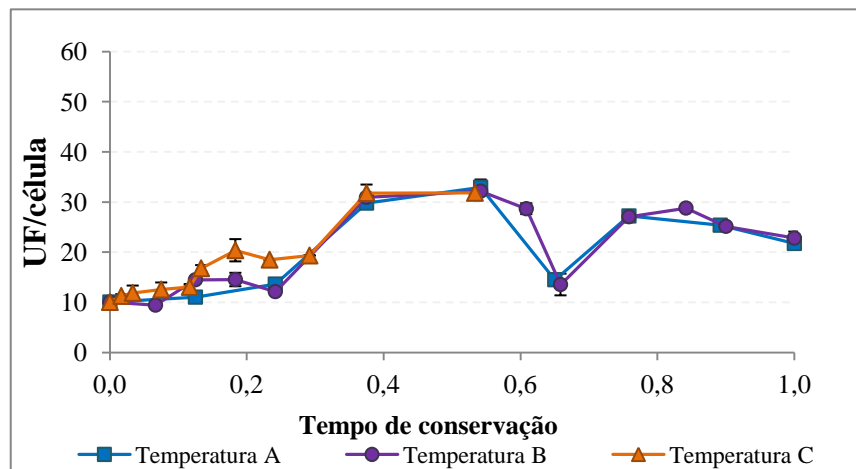
Relativamente à escolha da melhor temperatura de conservação para este ensaio verificou-se que o lote E21 pode ser conservado tanto em A como em B, uma vez que as leveduras não sofrerão alterações fisiológicas.



**Figura 27** – Evolução da atividade esterásica do lote E21 nas 3 temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação

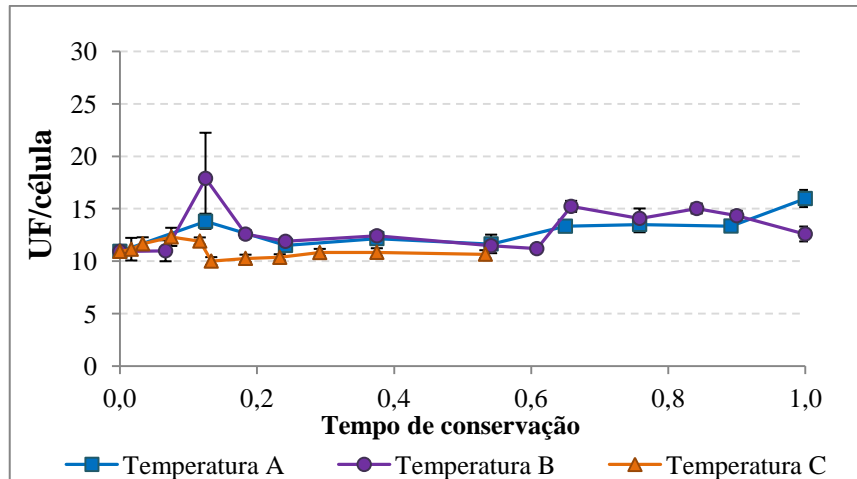
Um parâmetro relevante, medido neste ensaio, foi a atividade esterásica das leveduras nas 3 temperaturas. Na figura 28, registou-se um aumento de atividade das células à temperatura C, sendo as únicas que sofreram oscilações ao longo do ensaio. As variações observadas são várias e existe uma grande margem de erro. Embora as leveduras se apresentem com as mesmas condições, estas encontravam-se em embalagens diferentes e foram abertas em tempos diferentes para serem analisadas. Por fenómenos ainda desconhecidos, crê-se que as células não morrem todas da mesma maneira, umas morrem mais rapidamente que outras. Além disso, a temperatura influencia a atividade esterásica tornando a levedura instável e promovendo este tipo de comportamentos. Em relação as

células conservadas à temperatura A e B mantiveram uma atividade reduzida ao longo do tempo correspondendo a um estado fisiológico bastante favorável.



**Figura 28** – Evolução de teor em trealose do lote E21 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por célula.

Relativamente à quantificação de teores em trealose constatou-se, na figura 29, uma falta de coerência dos resultados obtidos pois foi observado um aumento seguido de uma perda de teores durante o estudo. A hipótese mais plausível para justificar este problema deve estar associada um problema analítico, um erro experimental associado ao reagente. Foi durante a troca de reagentes, no tempo de conservação de 0,66, que se observou comportamentos distintos quanto ao teor em trealose nas leveduras. O fluoróforo utilizado para quantificar o teor em trealose é um fluoróforo com moléculas fluorescentes que deve ser manuseado com extremo cuidado. Embora tenham sido tomadas várias precauções desde a sua conservação até à sua aplicação nas suspensões a serem incubadas, os resultados obtidos não permitem uma quantificação aproximada dos teores na célula. Desta forma, crê-se que o reagente comercializado pela Partec poderá ser de facto o ConA. Outra razão para pressupor que estes resultados não poderão ser tidos em conta deve-se o fato de que as células só sintetizarem a trealose, como fonte de reserva, quando sujeitas a condições de privação de hidratos de carbono, de elevadas concentrações de etanol ou de CO<sub>2</sub> [Wiemken, 1990]. Esta ocorrência aconteceu para os restantes ensaios, por isso não serão mencionados mais à frente.

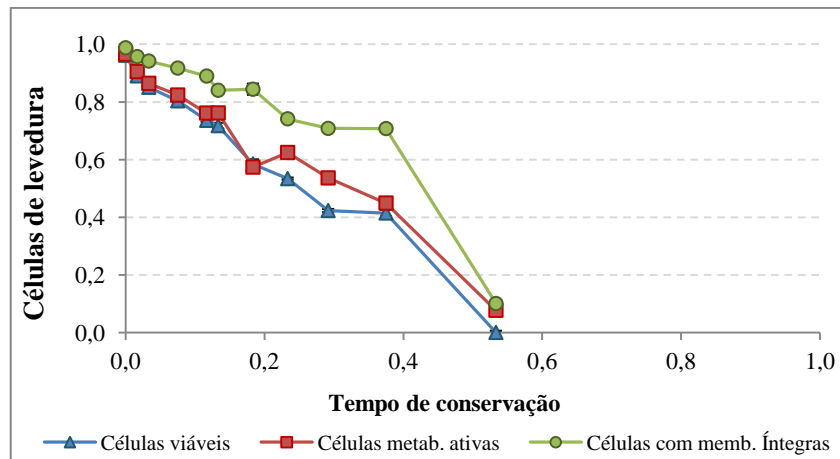


**Figura 29** – Evolução de teores em lípidos neutros do lote E21 às temperaturas de conservação de A, B e C ao longo do ensaio de conservação, expressa por Unidades de Fluorescência por células

Analisando a figura 30, verifica-se que os teores em lípidos nas células mantiveram-se constantes ao longo do ensaio, independentemente da temperatura de conservação. As leveduras não necessitaram de acumular nem de consumir lípidos neutros durante o período de conservação.

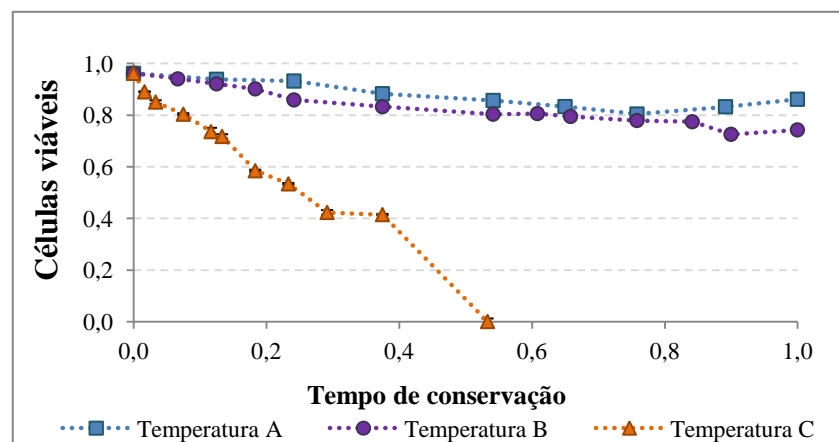
#### 4.3.2 Ensaio 2: Lote E24

Após a análise dos resultados obtidos, verifica-se as leveduras conservadas à temperatura A ou à B tiveram comportamentos semelhantes ao longo do ensaio. Tanto à temperatura A como à temperatura B, as leveduras sofreram uma perda gradual de viabilidade e vitalidade.



**Figura 30** – Evolução do estado fisiológico das células de leveduras do lote E24, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra, à temperatura C ao longo do tempo de conservação

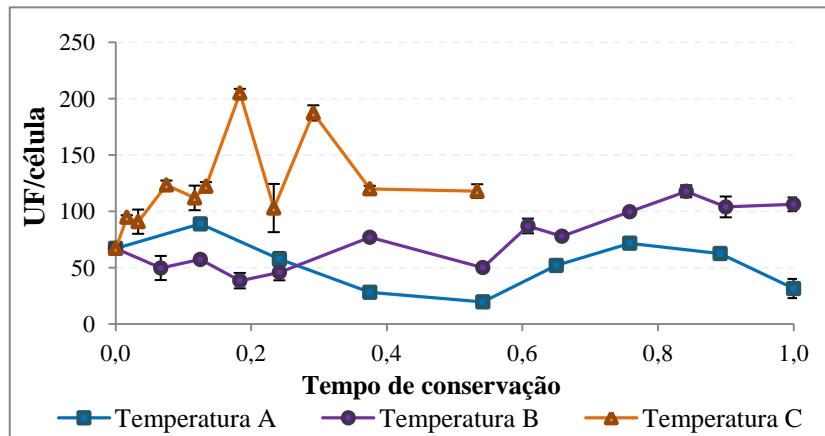
No entanto, feita uma análise à figura 31 constatou-se que as leveduras quando conservadas à temperatura C perdem viabilidade e vitalidade rapidamente. As leveduras aos serem sujeitas a esta condição, atingiram o limite estipulado para este ensaio, num tempo de conservação de 0,53.



**Figura 31** – Evolução do estado fisiológico das leveduras do lote E24, relativamente às células viáveis, nas temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação

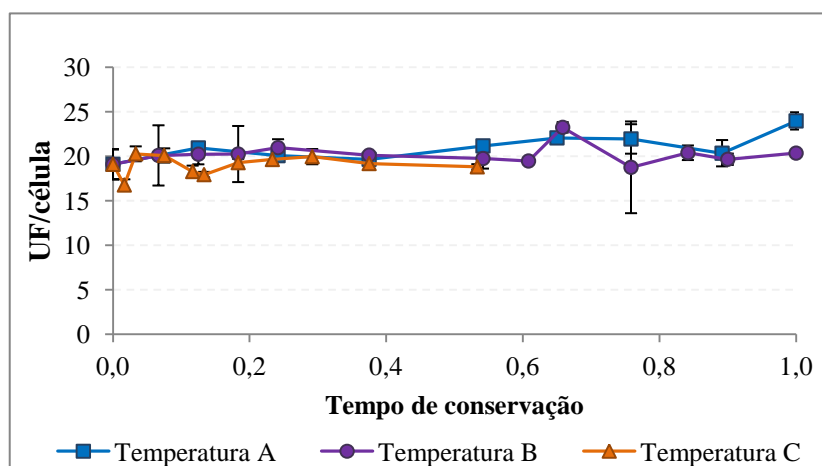
Comparando as três condições quanto à percentagem de células viáveis verificou-se que num período de conservação de 0,53, as leveduras à temperatura C perdem viabilidade e vitalidade, enquanto à temperatura A e B a perda é gradual e muito semelhante (figura 32). Desta forma, conclui-se que a melhor temperatura de conservação, para o lote E24, é a

temperatura A mas se, por circunstâncias, não haver condições ideais de conservação, poderá ser conservada à temperatura B visto que as alterações são insignificativas.



**Figura 32** – Evolução da atividade esterásica do lote E24 às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por células

Numa primeira análise à figura 33, verificou-se que as leveduras à temperatura C apresentam-se com elevadas variações de atividade esterásica. Esta eventualidade deve-se ao fato de as células estarem a perder rapidamente a sua viabilidade e vitalidade e de se tornarem bastante instáveis. Quanto às leveduras conservadas à temperatura B verifica-se que há um aumento gradual da atividade esterásica proporcional à perda de viabilidade e vitalidade das células. No que diz respeito às células conservadas à temperatura A, observou-se que a atividade mantém-se reduzida ao longo de todo o ensaio.

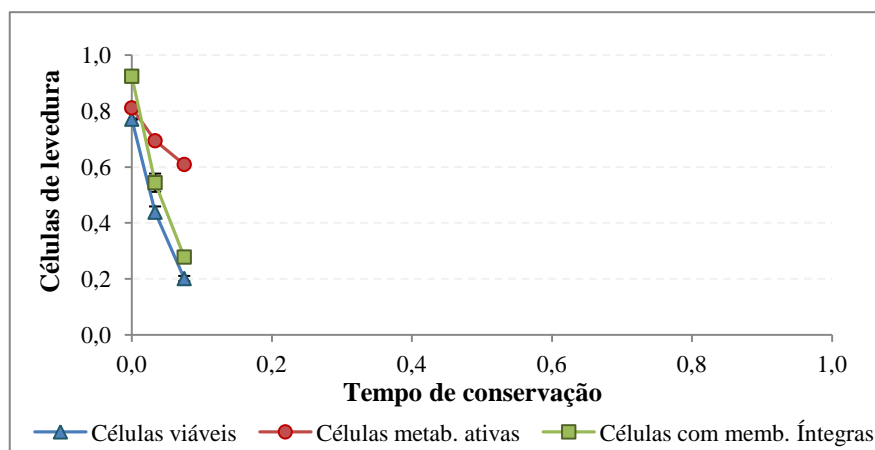


**Figura 33** – Evolução de teores em lípidos neutros do lote E24 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação, expressa em Unidades de Fluorescência por célula

Os resultados da figura 34 evidenciaram que as leveduras, para as três temperaturas de conservação, não acumularam nem consumiram lípidos neutros ao longo do ensaio. A fluorescência média medida foi sempre constante para todas as condições. Comparando este lote com o anterior, verifica-se que o E24 possui teores de lípidos mais baixos.

#### 4.3.3 Ensaio 3: Lote IE21

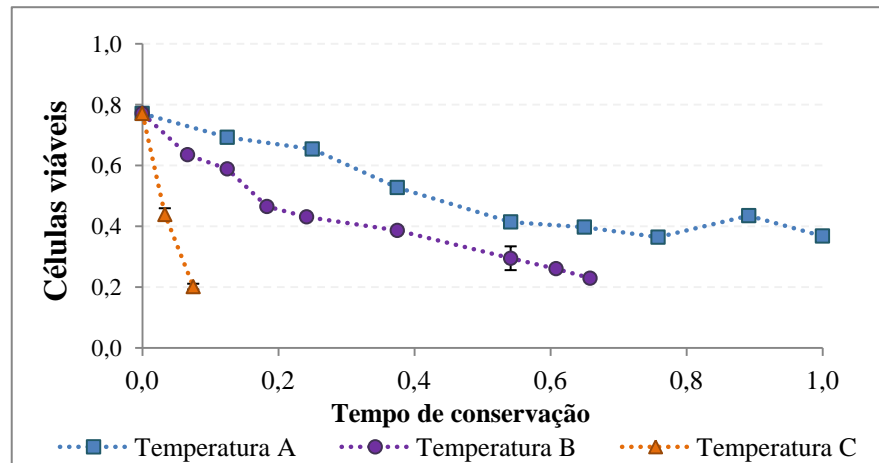
O lote IE21 foi produzido com uma composição diferente dos outros. Feita uma análise à viabilidade e vitalidade do lote IE21 observou-se uma perda de percentagem de células viáveis e de células com membrana íntegra acentuada, mais rápida à temperatura B do que à temperatura A. Porém, constatou-se que a perda de percentagem de células metabolicamente ativas é gradual à temperatura A e B. Isto indica que as células que se encontram viáveis, com o passar do tempo, permanecem ativas mas a sua integridade membranal fica fragilizada. Sendo assim, é só uma questão de tempo para que as células percam a sua atividade e morram.



**Figura 34** - Evolução do estado fisiológico das células de levedura do lote E21, relativamente às células viáveis, células metabolicamente ativas e células com membrana íntegra, à temperatura de conservação C ao longo do ensaio de conservação

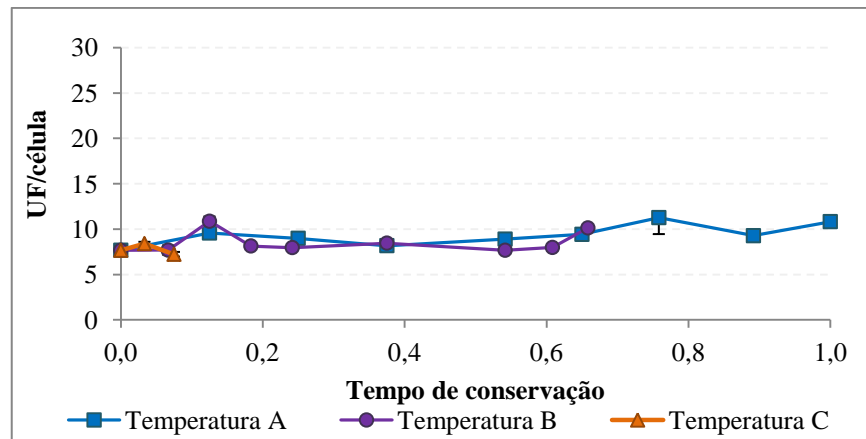
Como era esperado, as leveduras do lote IE21 apresentaram uma perda rápida de viabilidade e vitalidade, quando conservadas à temperatura C (figura 35). Sendo que o tempo de duração deste ensaio a esta temperatura foi apenas de 0,08. Observou-se uma

perda rápida de percentagem de células viáveis e de células com membrana íntegra e uma perda menos acentuada de percentagem de células metabolicamente ativas. Embora as células registem alguma atividade esterásica as suas membranas já se encontram comprometidas, sendo identificadas por células moribundas. Uma vez que o seu conteúdo intracelular não se encontra protegido por uma membrana intacta, acaba por se tratar de uma questão de tempo até as células serem conduzidas à morte celular.



**Figura 35** – Evolução do estado fisiológico das leveduras do lote IE21, relativamente às células viáveis, às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação

Ao comparar a percentagem de células viáveis na figura 36, observa-se que as leveduras do lote IE21 foram incapazes de sobreviver em qualquer uma das temperaturas de conservação propostas. Estas evidências permitem confirmar que as leveduras se encontram sujeitas a condições desfavoráveis, tais como, poucas reservas de carbono/energia, nutrientes e fraca capacidade de reparação membranar.



**Figura 36** - Evolução de teores em lípidos neutros do lote IE21 às temperaturas de conservação A, B e C, ao longo do ensaio de conservação

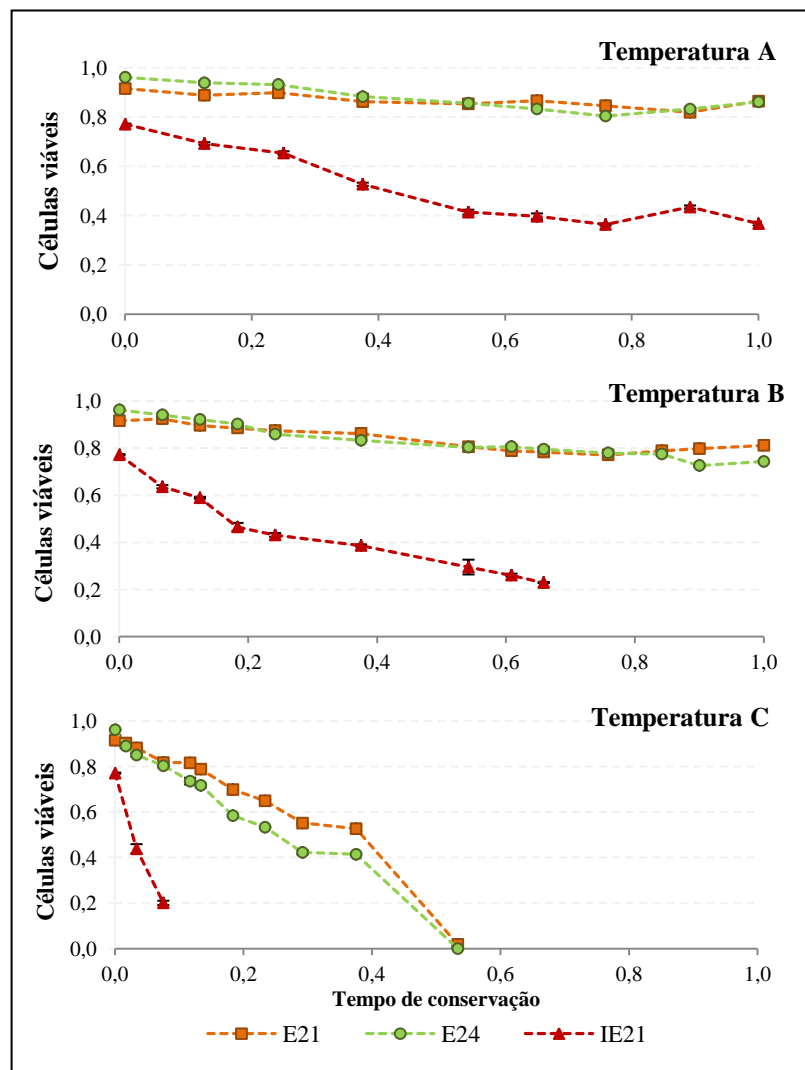
Um dado curioso é a análise dos lípidos neutros para IE21. Feita a observação da figura 37, verificou-se que, os teores em lípidos são baixos e que não houve o consumo nem acumulação dos mesmos ao longo do ensaio. Esta ocorrência reflete a incapacidade de reparação membranar por parte das células de leveduras quando conservadas a qualquer das temperaturas A, B e C. O teor de lípidos do lote IE21, em qualquer temperatura, apresenta-se mais baixo quando comparado com os outros lotes.

#### 4.3.4 Comparação dos lotes em conservação

Foram feitas contagens das células de leveduras por citometria de fluxo para todas as amostras deste ensaio de conservação. Em todos os ensaios, não se verificou crescimento celular durante os seus períodos de conservação.

De modo a avaliar o estado fisiológico das leveduras, compararam-se os resultados dos 3 ensaios às temperaturas de conservação A, B e C, quanto à percentagem de células viáveis ao longo do ensaio.





**Figura 37** – Evolução do estado fisiológico das leveduras, relativamente às células viáveis, dos lotes E21, E24 e IE21 às temperaturas de conservação A, B e C ao longo do ensaio de conservação

Com base nos resultados obtidos na figura 38, verificou-se que os lotes E21 e E24 sofreram uma perda gradual de viabilidade e vitalidade, quando conservadas à temperatura A, B e C. O lote E21, tendo sido produzido apenas 26 dias antes de se ter iniciado o ensaio, apresentou sinais de um bom estado fisiológico em que perda de células viáveis foi mínima. À temperatura C, a perda foi mais acentuada em ambos os lotes, em que no tempo de conservação de 0,5 atingiram a percentagem de células viáveis pré-determinada para o fim do ensaio. Quanto ao lote IE21, este apresentou melhores resultados quando conservado à temperatura A do que à B. As leveduras conservadas à temperatura B perderam células viáveis após um tempo de conservação de 0,7 ao contrário das leveduras

à temperatura A, que ainda se encontram com 0,4 de células viáveis, após terminado o ensaio à temperatura de conservação B. As leveduras de IE21 quando conservadas à temperatura C apresentaram uma perda de viabilidade e vitalidade mais acentuada. Assim, de acordo com o que era esperado, todas as respostas fisiológicas fornecidas pelas leveduras dos 3 ensaios indicaram a incapacidade de sobrevivência da população à temperatura C.

Observou-se que os 3 lotes quando comparados à mesma temperatura apresentaram 3 populações heterogêneas distintas quanto aos teores em lípidos neutros. Quando feitas comparações de teores nas 3 temperaturas para cada lote, observou-se que a temperatura de conservação não exerce qualquer tipo de influência sobre a síntese ou acumulação de lípidos neutros. Por esta razão não se verificaram variações de heterogeneidade nem consumo e/ou acumulação de teores de lípidos durante o ensaio em todos os lotes conservados às 3 temperaturas estudadas.

Quanto à heterogeneidade populacional, verificou-se que não houve variações na diversidade de populações das leveduras. A dispersão das intensidades médias de fluorescência expressas em valores percentuais de CV foi sempre uniforme, ao longo dos ensaios, em relação às atividades esterásicas e aos teores em lípidos neutros.

## 5 Conclusões e propostas de trabalhos futuros

### 5.1 Conclusões

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa bastante útil para a monitorização do estado fisiológico das células de levedura. Permite fornecer informações precisas sobre a viabilidade e vitalidade das células, avaliando a qualidade de LSE durante e após a produção de leveduras. Sendo assim, contribui para a otimização de processos fermentativos com o objetivo de torná-los mais eficientes e viáveis a nível económico.

O ensaio de rehidratação apresentou resultados curiosos quanto ao estado fisiológico das células. Embora não se tenha podido determinar a melhor temperatura de rehidratação, foi possível observar que durante todo o processo de rehidratação as células de levedura não perderam viabilidade e vitalidade. Quer isto dizer que, as leveduras quando sujeitas às condições de stress da rehidratação não sofrem alterações detetáveis a nível fisiológico pelos parâmetros utilizados por citometria de fluxo. No entanto, com base nos resultados obtidos por esta técnica, as leveduras poderão estar aptas a serem inoculadas em meios fermentativos.

No ensaio de inoculação, constatou-se que a rehidratação é uma etapa muito importante para a otimização da performance fermentativa das leveduras. De ambos os protocolos de inoculação com rehidratação, a IRA foi o que apresentou os melhores e surpreendentes resultados. Verificou-se que a adição de um suplemento nutritivo (Go-Ferm Protect) à solução de rehidratação é benéfica às células, adaptando-as às condições de stress da rehidratação e da segunda fermentação, sem que haja perda de viabilidade e vitalidade.

Quanto ao ensaio de conservação realizado concluiu-se que a temperatura ideal de conservação é a temperatura A. Porém, de forma surpreendente, as leveduras podem também ser armazenadas à temperatura B com uma perda de viabilidade e de vitalidade mínima, apresentando perdas semelhantes à da temperatura A. Quanto à temperatura de conservação C, verificou-se que as leveduras são incapazes de sobreviver a essa temperatura durante um logo período de conservação e que se trata de uma questão de tempo até serem conduzidas à morte celular. No entanto o ProElif® poderá ser conservado à temperatura C, até um tempo de conservação de 0,08, em situações excecionais (i.e. transporte do produto sem controlo de temperatura) sem que o estado fisiológico das leveduras seja comprometido. Sujeitar o produto ProElif® à temperatura C além desse

período de tempo não é recomendável. Com base nos resultados obtidos neste estudo, constatou-se que as percentagens de células viáveis de leveduras de E21 e E24 representam um modelo standard do estado fisiológico para as leveduras de ProElif®.

A técnica de citometria de fluxo foi implementada com sucesso na empresa, onde é usada quotidianamente para controlo de qualidade de leveduras secas imobilizadas, antes e após produção. Com o contributo desta técnica, a Proenol poderá vir a aumentar o potencial dos seus produtos na área da enologia.

## 5.2 Propostas de trabalho futuro

Ao longo deste trabalho foram obtidos resultados interessantes que evidenciam a importância de monitorizar os estados fisiológicos das leveduras em processos fermentativos.

Será importante continuar a realizar mais ensaios laboratoriais com a rehidratação das LSE, de forma a otimizar o processo quanto à temperatura e à solução de rehidratação. Em termos de recuperação da atividade metabólica, as soluções de rehidratação utilizadas neste trabalho demonstraram diferentes performances fermentativas. Uma maneira de determinar a vitalidade das leveduras poderá passar pela medição de CO<sub>2</sub> produzido em condições de rehidratação. Assim poderá ser monitorizado o desempenho da levedura perante o surgimento das condições adversas ao longo da rehidratação.

Um dos trabalhos futuros a realizar será a inoculação com rehidratação das leveduras em fermentações paradas, em garrafas. Desta forma será possível compreender o efeito da rehidratação em relação à pressão produzida na garrafa.

Em relação ao último ensaio, o ensaio de conservação, seria importante continuar a analisar os lotes E21 e E24 e determinar o tempo de conservação real de ambos, desde a sua produção até atingirem a percentagem de células viáveis pré-determinada. Assim, será possível estipular o tempo standard da conservação do produto de ProElif®. Quanto à temperatura de conservação C, seria pertinente avaliar e comparar o efeito fisiológico das leveduras que estiveram em situações excecionais e que foram conservadas novamente à temperatura A, com as esferas do mesmo lote conservadas sempre à temperatura A numa tentativa de mimetizar uma situação de transporte sem controlo de temperatura seguido de armazenagem à temperatura A.

## 6 Referências Bibliográficas

Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C., Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (2): 167–95.

Amor, K. B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. D. L., Vos, W. M. De, Abee, T. (2002). Multiparametric Flow Cytometry and Cell Sorting for the Assessment of Viable, Injured, and Dead *Bifidobacterium* Cells during Bile Salt Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5209–5216. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5209

Attfiel, P. V., Kletsas, S., Veal, D. A., Van Rooijen, R., Bell, P. J. L. (2000). Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 207- 214

Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D. (2003). *Yeasts: Characteristics and Identification*. 4<sup>th</sup> Edition, Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Bapat, P., Nandy, S. K., Wangikar, P., Venkatesh, K. V. (2006). Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): measurement of CFU in about 200 s. *Journal of Microbiological Methods*, 65 (1): 107–16. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.06.010

Bauer, F.F., Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine, a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 27–50.

Bekatorou, A., Psarianos, C. e Koutinas, A. A. (2006). Production of Food Grade Yeasts. *Food Technology Biotechnology Review*, 44 (3):407–415. ISSN: 1330-9862.

Beker, M. J., Blumbergs J. E., Ventina E. J. Rapoport A. I. (1984). Characteristic of cellular membranes at rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 19:347: 352.

- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 121 (2): 169–77.
- Bergmaier, D., Champagne, C. P., Lacroix, C. (2005). Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, 98 (2): 272-284. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02462.x
- Bisson L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology And Viticulture*. 50: 107-119.
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., Kunkee, R. (1999). *Principles and Pratices of winemaking*, Springer, New York.
- Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Rombouts, F. M., Abee, T. (1994). Energy-Dependent, Carrier-Mediated Extrusion of Carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* Allows Rapid Assessment of Cell Viability by Flow Cytometry. *Applied and Enviromental Microbiology*, 60 (5): 1467-1472.
- Bunthof, C. J., van Schalkwijk, S., Meijer, W., Abee, T., Hugenholtz, J. (2001). Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4264–4271.
- Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2012). Sparkling wines: features and trends from tradition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66: 1–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-394597-6.00001-X
- Carrascosa, A. V., Martinez-Rodriguez, A., Cebollero, E., González, R. (2011). *Saccharomyces* Yeasts II: Secondary Fermentation. *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press: 33-49.
- Chan, L. L., Lyettefi, E. J., Pirani, A., Smith, T., Qiu, J., Lin, B. (2011). Direct concentration and viability measurement of yeast in corn mash using a novel imaging

cytometry method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38 (8), 1109–15. DOI: 10.1007/s10295-010-0890-7

Chi, Z., Arneborg, N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 1047-1052.

Chlup, P. H. (2008). Biological and hydrodynamic stress influences on brewing yeast strains physiological status during beer production. Heriot-Watt University, Life Sciences, Doctoral Theses (Agosto de 2008).

Chlup, P. H., Bernard, D., Stewart, G. (2008). Disc stack centrifuge operating, parameters and their impact on yeast physiology. *Journal of the Institute of Brewing* 114 (1): 45–61.

Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M. J. (2002). Contributo da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, 71; 19-33.

Czabany, T., Athenstaedt, K., Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1771: 299-309.

D'Amore, T., Panchal, C. J., Russell, I., Stewart, G. G. (1990). A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9: 287-304.

Da Silva, T. L., Reis, A., Hewitt, C., Roseiro, C. (2004). Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, 77: 32-40.

Da Silva, T. L., Roseiro, J. C., Reis, A. (2012). Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends in Biotechnology*, 30 (4): 225–32.

Davey, H. M. (2011). Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (16): 5571–6. DOI: 10.1128/AEM.00744-11

Deak, T. (2009). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Satyanarayana, T.; Kunze, Gotthard (Eds.) XXI: 151–168. DOI: 10.1007/978-1-4020-8292-4

- Díaz, M.; Herrero, M.; García, L. A. Qirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Review: Biochemical Engineering Journal 48: 385–407.
- Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 85 (2): 253–63. DOI: 10.1007/s00253-009-2223-1
- Divies, C., Cachon, R., Microbiologie, L. De, Inra, U. M. R. (2005). Wine production by immobilised cell systems\_ Applications of Cell Immobilisation Biotechnology Focus on Biotechnology, 8 (B): 285-293.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., Carrol, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology, 3 (4): 17R-27R. DOI: 10.1093/glycob/cwg047.
- Fei, W., Wang, H., Fu, X., Bielby, C., Yang, H. (2009). Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry Journal, 424: 61-67.
- Fleet, G. F. (2008). Wine yeasts for the future. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research, Mini Review, 8 (7): 279-995. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- Flores, C-L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in nonconventional yeasts. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews 24: 507-529.
- França, M., Panek, A., Eleutherio, E. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. Comparative Biochemistry and Physiology, 146: 621-631.
- François, J., Parrou, J.L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews 25: 125– 145.
- Freeman, A.; Lilly, M. D. (1998). Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. Enzyme and Microbial Technology, New York, 23 (5): 335-345.



Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. (2007). Wine mictobiology. Pratical Applications and Procedures. Springer, 2<sup>nd</sup> edition.

Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, 130: 263-279.

Galbraith, D. W. (1989). Analysis of Higher-Plants by Flow-Cytometry and Cell Sorting" *International Review of Cytology*, 116: 165-228.

Gancedo, C., Flores, C. L.(2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. Mini Review. Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Yeast Research, 4: 351-359.

Garbarino, J., Sturley, S. L. (2005). Homoeostatic systems for sterols and other lipids. *Biochemical Society Transactions*, 33 (5):1182-5.

Garbayo, I.; Vilchez, C.; Nava-Saucedo, J. E.; Barbotin, J. N. Nitrogen, carbon and lightmediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzymeand Microbial Technology*, New York, 33 (5): 629-634.

García, V. (2004) Introducción a la Microbiología. 2<sup>nd</sup> Ed., EUNED, Costa Rica.

Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Viswanatha, R., Antosh, A. L., Brown, W. J., Kohlwein, S. D., Henry, S. a. (2008). A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (37): 25735–51.

Godia, F., Casas, C., Sola, C. (1991) Application of immobilized yeast cells to sparkling wine fermentation. *Biotechnology Progress*, 7 (5): 468-470.

Goodman, J. M. (2008). The gregarious lipid droplet. *Journal of Biological Chemistry*, volume 283 (42): 28005-28009.

Haugland, P. (2005) Molecular-probes handbook of fluorescent probes and research chemicals, 10th Edition. Molecular Probes. Inc., Eugene. <http://www.probes.com>

- He, S., Bystricky, K., Leon, S., François, J.M., Parrou, J.L. (2009). The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology (FEBS) Journal*, 276: 5432-5446.
- Hewitt, C. J., Nebe-Von-Caron, G. (2001). An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, 44 (3): 179–87.
- Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S., Saint, C.P. (2003). Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparision to culture-based techniques. *Journal of Microbiology Methods*, 55: 585-597.
- Huang, J., Reggiori, F., Klionsky, D. J. (2007). The transmembrane domain of acid trehalase mediates ubiquitin-independent multivesicular body pathway sorting. *Molecular Biology of the Cell*, 18 (7): 2511-2524. DOI: 10.1091/mbc.E06-11-0995.
- Hutter, K. (2002) Flow cytometric determinations of glycogen content of yeast during fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108 (1): 48–51.
- Iturriaga, G., Suarez, R., Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling” . *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (9): 3793-3810. DOI: 10.3390/ijms10093793.
- Jackson, R.S. (2000). *Wine science: Principles, Practice, Perceptin*. Academic Press, 2<sup>nd</sup> Edition, 5-18.
- Jamai, L.; Sendide, K.; Ettayebi, K.; Errachidi, F.; Hamdouni-Alami, O.; Tahri-Jouti, M. A.; McDermott, T.; Ettayebi, M. (2001). Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicallis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*, Amsterdam, 204 (2): 375-379.

Jenkins, D. M., Powell, C. D., Fischborn, T., Smart, K. A., Brew, J. I. (2011). Rehydration of Active Dry Brewing Yeast and its Effect on Cell Viability. *Journal of the Institute of Brewing*, 117 (3): 377–382.

Jules, M., Beltran, G., François, J., Parrou, J. (2008). New Insights into Trehalose Metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: *NTH2* Encodes a Functional Cytosolic Trehalase, and Deletion of *TPS1* Reveals Ath1p-Dependent Trehalose Mobilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (3): 605. DOI: 10.1128/AEM.00557-07.

Jules, M., Guillou, V., François, J., Parrou, J. (2004). Two Distinct Pathways for Trehalose Assimilation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 70 (5): 2771–2778. DOI: 10.1128/AEM.70.5.2771–2778.2004

Julien A., Roustan J. L., Dulau, L., Sablayrolles, J. M. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(3): 215-222.

Junter, G.-A., Jouenne, T. (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome em leader or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, 22 (8): 633–58. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2004.06.003

Keller, F., Schellenberg, M., Wiemken, A. (1982). Localization of Trehalase in Vacuoles and of Trehalose in the Cytosol of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Archive of Microbiology*, 131: 298-301.

Kolber, M. A, Quinones, R. R., Gress, R. E., Henkart, P. A. (1988). Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *Journal of Immunological Methods*, 108: 255–264

Kosseva, M. R. (2010). Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (6): 1089–1118. DOI: 10.1007/s11947-010-0435-0

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R., Koutinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21 (4): 377–397.

Krieger-Weber, S. (2009). Application of yeast and bacteria as starter cultures. In: König, H., Unden, G. & Frohlich, J. (Editors). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, Berlin. pp. 498-511. ISBN 978-3-540-85463-0

Kurtzman, C. P., Fell, J. W. (1998). *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 4<sup>th</sup> Edition, Elsevier Science, Amsterdam.

Lehnert, R., Kuřec, M., Brányik, T., Mota, A., Teixeira, J. A. (2007). Assessment of brewing yeast age based on selective bud scar staining and subsequent fluorescence measurement by flow cytometry. Congress European Brewery Convention, 31, Venice, Italy, 2007 – “EBC Congress”.

Loureiro, J. S., C. (2004). Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, 77: 18-29.

Lucero, P., Peñalver, E., Moreno, E., Lagunas, R. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4456–61.

Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leão, C., Côrte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid”. *Journal of the Society for General Microbiology (SGM)*, 147: 2409-20415.

Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (3): 829–45. DOI: 10.1007/s00253-010-2594-3

Majara, M., O'Connor-Cox, E.S.C., Axcell, C. (1996). Trehalose: an osmoprotectant and stress indicator in high and very high gravity brewing. Brewing Research and Development Department South African Breweries Ltd., American Society of Brewing Chemists, 54 (3): 149–154.

Manginot, C., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 511-517.

Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G. A., Goffrini, P., Lodi, T. (2008). Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International Journal of Food Microbiology*, 121 (1): 84–91.

Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) yeast research*, 12 (4): 477–85. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x

Melzoch, K.; Rychtera, M.; Habova, V. (1994). Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology, Amsterdam*, 31 (1): 59-65. ISSN: 0168-1656. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90120-1.

Moreira, M. T.; Palma, C.; Feijoo, O.; Lema, J. M. (1998). Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology, Amsterdam*, 66: 27-39.

Müllner, H., Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta biochimica Polonica*, 51 (2): 323–47.

Nedovic, V., Willaert, R. (2005). *Applications of Cell Immobilization Biotechnology, Focus on Biotechnology*, volume 8B. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-1-4020-3363-6.

Neves, M.-J., Francois, J. (1992). On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 288: 559-864

Norton, S.; Watson, K.; D'Amore, T. (1995). Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 43: 18-24.

- Novo, M., G. Beltran, M.J. Torija, M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guil-lamón, and A. Mas. (2003). Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 86: 153-161.
- Ocampo, A., Barrientos, A. (2011). Quick and reliable assessment of chronological life span in yeast cell populations by flow cytometry. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132 (6-7): 315–23. DOI: 10.1016/j.mad.2011.06.007
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Molecular Biology*, 64: 34-50.
- Palácios, A., Centeno, F., Teixeira, M. F. (2005). Características fermentativas da levedura QA23. *Publicação Proenol- QA23 no mundo- em parceria com Lallemend*, 1–6.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J. M., Matallana, E. (2005). Monitoring Stress-Related Genes during the Process of Biomass Propagation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used for Wine Making. *Applied Enviromental Microbiology*, 71: 6831-6837.
- Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J. V., Matallana, E. (2002). Wine yeast strains engineered for glycogen over production display an enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7): 3339–3344.
- Pozo-Bayón, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., Moreno-Arribas, M. V. (2009). Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (6-7): 289–299. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.03.011
- Pradella, J. G. C. (2001). Reatores com células imobilizadas. In: Schimdell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzan, W. *Biotecnologia Industrial*. 16: 355- 372.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast, Review*, 16 (8): 675–729. DOI: 10.1002/1097-0061(20000615)

Proenol (2012). Ficha técnica informativa do produto ProElif®, comercializado pela empresa Proenol - Indústria Biotecnológica, Ltd. <http://ebookbrowse.com/proelif-user-s-guide-english-pdf-d114867143>. Acedido a 15 de Dezembro.

Rajakumari, S., Grillitsch, K., & Daum, G. (2008). Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in lipid research*, 47 (3), 157–71. DOI: 10.1016/j.plipres.2008.01.001

Redón, M., Guillamon, J. M., Mas, A., Rozes, N. (2008). Effect of active dry wine yeast storage upon viability and lipid composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2555–2563.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvand, A. (2006). Biochemistry of Alcoholic Fermentation and Metabolic Pathways of Winw Yeasts. *Handbook of Enology*, John Wiley & Sons, Ltd: 53-77.

Salvad, Z. (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast*, 25: 1005–1015. DOI: 10.1002/yea

Silljé, H., Paalman, J., Schure, E., Olsthoorn, S., Verkleik, A., Boonstra, J. e Verrips, C. (1999). Function of Trehalose and Glycogen in Cell Cycle Progression and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 181 (2): 396-400.

Shapiro H. (2003). *Practical Flow Cytometry*. 4<sup>th</sup> Edition. New York, NY: Alan R. Liss.

Sugihara, M., Imai, T., Muro, M., Yasuda, Y., Ogawa, Y. (2006). Application of Flow cytometer to Analysis of Brewing Yeast Physiology. *Applications of Flow Cytometer Physiological State of Yeast*, 28: 1–5.

Soubeyrand, V., Julien, A., Sablayrolles, J. (2006). Rehydration Protocols for Active Dry Wine Yeasts and the Search for Early Indicators of Yeast Activity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 474–480.

- Talebnia, F. (2008). Ethanol Production from Cellulosic Biomass by Encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*. Chalmers University of Technology, Sweden. Doctoral Theses.
- Thevissen, K.; Kathelijne, K. A.; Ferket, I.; François, E. J. A.; Cammue, B. P. A. (2003). Interactions of antifungal plant defenses with fungal membrane components. *Peptides*, 24 (11): 1705-1712.
- Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., Von Caron, G. N., Ter Steeg, P. F. (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28 (2), 317–26.
- Walker, G. M., Van Dijck, P. (2006). Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. In: Querol A., Fleet G.H. (Editors), *Yeasts in Food and Beverages. The Yeast Handbook*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 111–152.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Leeuwenhoek*, 58 (3): 209-217. DOI: 10.1007/BF00548935
- Wingler, A. (2002). The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 60: 437-440.
- Worthington, K., Worthington, V. (2013). *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical Corporation. Acedido em 03 Novembro de 2013. ([www.worthington.bichem.com/cona/default.html](http://www.worthington.bichem.com/cona/default.html))
- Zoecklein, B. (2002). A review of Méthode champenoise production. Virginia Tech. Reprinted 2002. Publication 463-017W.
- Zuzuaregui A., Monteoliva L., Gil C., Del Olmo M. (2006). Transcriptomic and proteomic approach of understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (1): 836- 847.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K., Daum, G., (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochemical and Biophysical Acta* 1469 (2), 101–120.



## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO A: Plano de Trabalho na Proenol

O plano de trabalho apresentado define as principais tarefas a executar, bem como a sua duração e períodos de execução previstos.

Actividade	Duração Prevista (semanas)	Período
(1) Pesquisa bibliográfica	16	Set – Dez
(2) Formação em citometria de fluxo - FCUL	8	Out –Nov
(3) Implementação da técnica de citometria de fluxo na Proenol	12	Fev – Abril
(4) Avaliação do estado fisiológico das células de levedura a diferentes protocolos de rehidratação, de inoculação e a diferentes temperaturas de conservação.	28	Abril – Out
(5) Redação da tese	8	Set – Out

## ANEXO A.1

Tabela 7 – Planeamento de trabalho, ao longo dos meses de estágio na Proenol

Actividade		Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro
1	P	X													
	R	X													
2	P					X	X								
	R					X	X								
3	P														
	R									X					
4	P											X			
	R											X			
5	P														X
	R														X

Legenda:

**P** – Previsto

**R** – Realizado

**X** – Reuniões de revisão acompanhadas de relatórios intercalares.